

**Rhadinovirale Vektoren zum Transfer
unter Latenz exprimierter oder induzierbarer Gene
in primäre T-Lymphozyten, Hepatozyten
und sensorische Neurone
und zur Umleitung der T-Zell-Spezifität
auf ein Tumorantigen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Linda Bremer

Kiel, 2014

Erster Gutachter: **Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher**

Zweiter Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Axel Scheidig**

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2014

Zum Druck genehmigt: 12. März 2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

MEINER FAMILIE

WICHTIG IST,
DASS MAN NICHT AUFHÖRT ZU FRAGEN.
Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Herpesvirus saimiri	3
2.2	Bakterielle artifizielle Chromosomen	5
2.3	Gegen ErbB2 gerichteter chimärer T-Zell-Rezeptor	7
2.3.1	T-Zell-Rezeptor-Komplex und Signalwege	7
2.3.2	Das Zielantigen ErbB2	10
2.3.3	Chimäre T-Zell-Rezeptoren	12
2.4	Induziert exprimierte Transgene	14
2.4.1	Tetracyclin-Doppelschalter-System	14
2.4.2	Doxycyclin-induzierte Apoptose	16
2.4.3	Zelltyp-spezifische Doxycyclin-Doppelschalter	19
2.4.4	Glykoprotein 130	20
2.5	Viraler Gentransfer	22
2.6	MicroRNAs bei Herpesvirus saimiri	25
2.7	Genomsequenzierung von Herpesvirus saimiri	27
2.8	Zielsetzungen der Arbeit	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Material und Reagenzien	30
3.1.1	Plasmide, BACs und Bakterien	30
3.1.2	Zelllinien	31
3.1.3	Rekombinante Mutanten von Herpesvirus saimiri	33
3.1.4	Oligonukleotide	35
3.1.5	Restriktionsenzyme	38
3.1.6	Antikörper und Reagenzien	39
3.1.7	Medium und Puffer	42
3.2	Molekularbiologische Methoden	44
3.2.1	Aufreinigung von DNA	44

3.2.2	Klonierung	45
3.2.3	<i>En passant</i> -Mutagenese	46
3.2.4	RNA-Analysen	47
3.2.5	Protein-Analysen	49
3.3	Zellbiologische Methoden	50
3.3.1	Zellkultur	50
3.3.2	Transfektion und Viruskultur	51
3.3.3	Transduktion von Zielzellen	52
3.3.4	Fluoreszenz-Mikroskopie	53
3.3.5	Durchflusscytometrie	54
3.3.6	Cytotoxizitätstests	55
3.3.7	Magnetische Zellsortierung	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Rekombinanter T-Zell-Rezeptor auf humanen T-Lymphozyten	58
4.1.1	Virusvektoren für den chimären T-Zell-Rezeptor	59
4.1.2	Funktionelle Transgenexpression über zwölf Monate	61
4.1.3	Zielzellspektrum für die Lyse durch den cTCR	67
4.1.4	Vergleich von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten in der spezifischen Tu- morzelllyse	74
4.2	Tumorspezifische Transgenexpression durch regulatorische Elemente des Alpha- Fetoproteins	76
4.2.1	Virusvektoren mit der regulatorischen Kassette des AFP-Gens	78
4.2.2	AFP-Produktion in den Tumorzellen	79
4.2.3	Zelltyp-spezifisch induzierbares eGFP	80
4.2.4	Versuche zur Induzierbarkeit der Apoptose in Hepatomzellen	83
4.3	T-Zell-spezifische Expression durch den CD2-Enhancer-Promotor	89
4.3.1	Virusvektoren mit regulatorischen Elementen des CD2-Gens	91
4.3.2	T-Zell-spezifisch induzierbares eGFP	92
4.3.3	Induzierbarkeit der Apoptose in T-Lymphozyten	94
4.4	Glykoprotein 130	96
4.4.1	Virusvektoren mit konstitutiver oder induzierter Expression von gp130 und dsRed	96
4.4.2	Expressionskontrolle in OMK- und Hamsterzellen	99

4.4.3	Funktionelle Expression von gp130 durch rhadinovirale Vektoren	100
4.4.4	Transduktion sensorischer Neurone von gp130-Defekt-Mäusen	101
4.5	miRNA von Herpesvirus saimiri	102
4.6	Pyrosequenzierung des Virusvektors mit mini-F-Fragment	106
5	Diskussion	107
5.1	Umleitung der T-Zell-Spezifität auf ein Tumorantigen durch rhadinovirale Vektoren	107
5.2	Tumorspezifische Transgenexpression durch regulatorische Elemente des Alpha-Fetoproteins	116
5.3	T-Zell-spezifische Expression durch den CD2-Enhancer-Promotor	121
5.4	Glykoprotein 130	122
5.5	miRNAs von Herpesvirus saimiri	123
6	Abkürzungsverzeichnis	125
7	Literaturverzeichnis	130
	Danksagung	154
	Lebenslauf	155
	Eidesstattliche Erklärung	159

1 Zusammenfassung

Herpesvirus saimiri ist ein Rhadinovirus von Neuwelt-Primaten, kann verschiedene humane und nicht humane Zelltypen und Zelllinien infizieren und eignet sich für viele Fragestellungen des viralen Gentransfers. Das virale Genom lag als bakterielles artifizielles Chromosom kloniert vor und konnte dadurch schnell und zielgerichtet manipuliert werden. Die Integrität des klonierten Virusgenoms wurde durch Pyrosequenzierung bestätigt. Verschiedene umfangreiche Fremdgen-Sequenzen wurden in unterschiedliche Bereiche des Virusgenoms eingesetzt. Bei diesen Fremdsequenzen handelte es sich entweder um konstitutiv exprimierte oder um regulierte Gene, die mit dem Tetracyclin-Doppelschalter-System gezielt ein- und ausgeschaltet werden können. Erstens wurde ein chimärer T-Zell-Rezeptor gegen die humane Rezeptortyrosinkinase ErbB2 als konstitutiv während der latenten Persistenz exprimiertes Transgen in das virale Vektorkonstrukt inseriert. ErbB2 ist auf der Zelloberfläche bei vielen Mamma- und Ovarialkarzinomen überexprimiert. Mit dem rekombinanten Virusvektor wurden humane T-Lymphozyten transduziert. Die Expression des chimären T-Zell-Rezeptors und seine starke cytotolytische Aktivität auf ErbB2-positive Tumorzellen war langfristig nachweisbar und wurde über ein Jahr untersucht. Zweitens wurden virale Vektoren hergestellt, bei denen die Transgenexpression durch eine Variante des Tetracyclin-Doppelschalters reguliert wird, bei dem die Transregulatoren abhängig vom Alpha-Fetoprotein-Enhancer-Promotor nur in Alpha-Fetoprotein-positiven humanen Hepatomzellen exprimiert werden können. Dies wurde mikroskopisch für das grün fluoreszierende Protein gezeigt, sowie funktionell für die durch tBid induzierte Apoptose. Drittens wurde der Tetracyclin-Doppelschalter in einer Variante erprobt, bei der die Transregulatoren unter Kontrolle des CD2-Enhancer-Promotors standen. Hier war allerdings die Transgenexpression stark eingeschränkt und die induzierte Apoptose nicht nachweisbar. Viertens wurden rhadinovirale Vektoren für das murine Glykoprotein gp130 in konstitutiver und regulierter Variante hergestellt. Diese Vektoren führten bei Hamsterzellen zur Empfindlichkeit auf IL-6 und waren in der Lage, das Neuritenwachstum bei sensorischen Neuronen aus gp130-Defekt-Mäusen zu rekonstituieren. In einem fünften Projektteil wurden neuartige miRNA-Kandidaten des Herpesvirus saimiri identifiziert und auf ihre Prozessierung und Funktion untersucht. Insgesamt konnten somit Herpesvirus-saimiri-Vektoren für den Gentransfer wesentlich weiter entwickelt werden, besonders für die Anwendung zur Umlenkung der T-Zell-Spezifität auf Tumorantigene.

Summary

Herpesvirus saimiri is a rhadinovirus of New World primates, is able to infect various human and non-human cell types and cell lines and is useful for many aspects of viral gene transfer. The viral genome was already available as a cloned bacterial artificial chromosome and could be rapidly manipulated in a targeted way. The integrity of the cloned virus genome was confirmed by pyrosequencing. Various extensive foreign gene sequences were inserted in different areas of the virus genome. These foreign sequences were either constitutively expressed or regulated genes, which could be switched on or off using the tetracyclin double-switch system, selectively. First, a chimeric T-cell receptor against the human receptor tyrosine kinase ErbB2 was inserted into the viral vector construct as a constitutively expressed transgene during latent persistence. ErbB2 is overexpressed on the cell surface of many mammary and ovarian carcinomas. Human T lymphocytes were transduced with the recombinant virus vectors. The expression of the chimeric T-cell receptor and its strong cytolytic activity on ErbB2-positive tumor cells was stably detected and was investigated over one year. Secondly, virus vectors were generated, in which transgene expression is regulated by a variant of the tetracyclin double switch in which the transregulators can be expressed dependent on the alpha-fetoprotein enhancer promoter only in alpha-fetoprotein-positive human hepatoma cells. This was shown by microscopy for the green fluorescent protein, as well as functionally for tBid-induced apoptosis. Thirdly, the tetracyclin double switch was tested in a variant in which the transregulators were controlled by the CD2 enhancer promoter. Here, transgene expression was limited and induced apoptosis was not detectable. Fourthly, rhadinoviral vectors for the murine glycoprotein gp130 were generated in constitutive and regulated versions. The vectors induced IL-6 sensitivity in hamster cells and were able to reconstitute neurite growth in sensory neurons of gp130 defect mice. In a fifth project part, novel miRNA candidates of herpesvirus saimiri were identified and investigated concerning their processing and function. Taken together, herpesvirus saimiri vectors were considerably further developed, particularly for the redirection of T-cell specificity towards tumor antigens.

2 Einleitung

2.1 Herpesvirus saimiri

Die Vertreter der Familie *Herpesviridae* sind behüllte Viren, deren Genom aus doppelsträngiger, linearer DNA besteht [Abb. 2.1]. Herpesviren haben die Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz im Wirtsorganismus. Die Virusfamilie wurde in die drei Unterfamilien α , β und γ eingeteilt. Zu den α -Herpesviren zählen sowohl das Herpes-Simplex-Virus (HSV) als auch das Varicella-Zoster-Virus. Der bekannteste Vertreter der β -Herpesviren ist das humane Cytomegalovirus. Die γ -Unterfamilie enthält lymphotrope Viren, die nochmals in die Lymphokryptoviren (u.a. Epstein-Barr-Virus) und die Rhadinoviren untergliedert ist. Zur letzten Gruppe, den γ_2 -Herpesviren, gehört das humanpathogene Kaposi-Sarkom-Virus (HHV8) und das Herpesvirus saimiri (HVS). HVS lässt sich aufgrund seines pathogenen Potentials und seiner Sequenzvariabilität in die drei Untergruppen A, B und C unterteilen. Die stärkste transformierende Wirkung besitzen Vertreter der Untergruppe C [Fickenscher und Fleckenstein, 2001]. Das virale Genom des Stammes C488 von HVS wurde vollständig sequenziert [Ensser et al., 2003] und als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) kloniert [Toptan et al., 2010a].

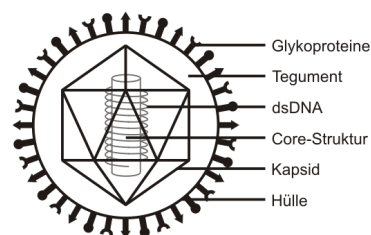


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines HVS-Virion. Das Genom aus doppelsträngiger DNA ist auf einer Core-Struktur aufgewunden und befindet sich in einem ikosaedrischen Kapsid. An das Kapsid schließt sich nach außen das Tegument an. Deren Proteine fördern u.a. die virale DNA-Replikation und die Immunevasion. Das Tegument wird von der Virushülle zusammengehalten, welche mit Glykoproteinen besetzt ist, die u.a. für die Interaktion mit der Zellmembran verantwortlich sind. Der Durchmesser von Rhadinovirus-Partikeln beträgt 150 bis 200 nm.

Das HVS-Genom besteht aus einem repetitiven, nicht codierenden Bereich (H-DNA), der einen hohen GC-Gehalt (71 %) besitzt, und aus der codierenden L-DNA mit niedrigem GC-Gehalt [Abb. 2.2]. Letztere macht mit 113.027 Basenpaaren (bp) den größten Teil des Genoms aus und enthält mindestens 75 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) und fünf bis sieben

U-RNA-Gene [Albrecht et al., 1992]. Diese kleinen viralen regulatorischen RNAs binden an Wirts-RNAs. Die repetitiven Sequenzen der H-DNA von HVS C488 bestehen z.B. aus Wiederholungen von 1.318 und 1.458 bp und flankieren die L-DNA. Das gesamte Genom wird als M-DNA bezeichnet und umfasst 130.000 bis 160.000 bp in Abhängigkeit von der Anzahl der H-DNA-Elemente [Ensser et al., 2003].

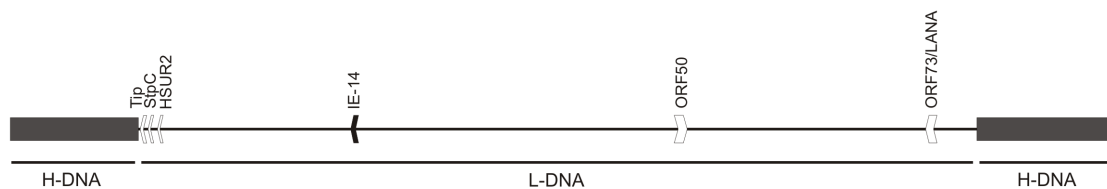


Abb. 2.2: Aufbau des HVS-Genoms. Die L-DNA befindet sich zwischen der repetitiven H-DNA und enthält die offenen Leserahmen. Als weiße Pfeilspitzen sind wichtige HVS-Gene dargestellt. Am linken Ende der L-DNA befindet sich die bicistronische Transkriptionseinheit für die viralen Onkoproteine Saimiri-transformationsassoziiertes Protein der Untergruppe C (StpC) und Tyrosinkinase-interagierendes Protein (Tip). Diese beiden Genprodukte sind für die Transformation humaner T-Lymphozyten entscheidend. Daneben befinden sich die sieben U-RNAs von HVS. Das Produkt von *ORF73* gilt als Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen (LANA), das in bestimmten Zelltypen den Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus inhibiert, indem es an den Promotor von *ORF50* bindet [Schäfer et al., 2003]. *ORF50* codiert für ein transaktivierendes Protein, das für die Virusreaktivierung und lytische Replikation notwendig ist [Thurau et al., 2000]. Als schwarze Pfeilspitze ist *ORF14* abgebildet, das für ein virales Superantigenhomolog codiert und während der Latenz transkribiert wird [Knappe et al., 1997].

Der natürliche Wirt von HVS ist das Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*), in dem das Virus apathogen persistiert. Bei anderen Neuweltaffen wie Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), Lisztaffen (*Saguinus oedipus*) und Löwenäffchen (*Leontopithecus rosalia*) kommt es nach einer HVS-Infektion zu akuten T-Zell-Lymphomen und lymphatischen Leukämien [Fleckenstein und Desrosiers, 1982]. Die Erstisolation von HVS gelang aus der Nierenzellkultur eines gesunden Totenkopffäffchens [Melendez et al., 1968]. In Nachtaffen-Nierenzellen (*owl monkey kidney*, OMK) repliziert HVS produktiv und induziert zu einem späten Zeitpunkt die Zelllyse [Arvin et al., 2007]. In der zoologischen Systematik bilden die Krallenaffen eine Gruppe der Neuweltaffen, zu der auch die Weißbüschelaffen und Löwenäffchen gezählt werden.

In vitro können HVS-Stämme der Untergruppe C humane T-Lymphozyten zu Antigen-unabhängigem Wachstum transformieren [Biesinger et al., 1992], wobei die Gene für die Onkoproteine Saimiri-transformationsassoziiertes Protein der Untergruppe C (StpC) und Tyrosinkinase-interagierendes Protein (Tip) essentiell sind [Knappe et al., 1997; Duboise et al., 1998]. In humanen T-Lymphozyten persistiert HVS als Episom in hoher Kopienzahl. Bisher ist kein Fall bekannt, bei dem das virale Genom in das zelluläre Chromosom integriert

wurde. Die Zellen weisen weiterhin einen normalen Karyotyp auf [Troidl et al., 1994]. Durch Behandlung latent infizierter humaner T-Zellen mit Phytohemagglutinin A, Concanavalin A oder Phorbol-12-myristat-13-acetat kann zwar die virale Genexpression teilweise aktiviert werden, aber nicht die Produktion und Freisetzung von HVS [Fickenscher et al., 1996]. C488-transformierte T-Lymphozyten gleichen phänotypisch normalen aktivierten T-Zellen. Sie tragen die Oberflächenmoleküle CD2, CD3, CD5, CD7 und CD4 und/oder CD8 [Biesinger et al., 1992]. CD2 interagiert mit LFA-3 (*lymphocyte function-associated antigen-3*), was zur Aktivierung einer Signalkaskade in den Zellen führt und die kontinuierliche Proliferation unterstützt (CD2-Hyperreaktivität) [Mittrücker et al., 1992]. Die C488-transformierten T-Zellen produzieren Typ1-T-Helferzellen-Cytokine Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- γ [Bröker et al., 1993; de Carli et al., 1993; Weber et al., 1993]. Außerdem konnte durch verschiedene Antigene wie dem Myelin-basischen Protein [Weber et al., 1993; Meinel et al., 1995] und dem Tetanustoxin [Bröker et al., 1993] gezeigt werden, dass die Haupthistokompatibilitätskomplex-beschränkte Antigenpezifität des T-Zell-Rezeptors nach der Transformation erhalten bleibt.

Erstmals setzte Desrosiers im Jahr 1985 HVS als viralen Vektor ein, um Neuweltprimaten mit HVS-Vektoren zu infizieren, die das bovine Wachstumshormon produzierten [Desrosiers et al., 1985]. HVS hat wesentliche Vorteile als Vektor zur Transgen-Expression: Erstens hat HVS eine hohe Klonierungskapazität für Transgene, die in dieser Arbeit für Insertionen von bis zu 11 kb genutzt wurde. Zweitens kann HVS stark unterschiedliche Zelltypen infizieren bzw. transduzieren. Drittens persistieren HVS-Vektoren episomal ohne Integration und erlauben, viertens, eine langfristige Transgenexpression [Hiller et al., 2000].

2.2 Bakterielle artifizielle Chromosomen

Das bakterielle artifizielle Chromosom (BAC) von HVS C488 wurde durch Cosmidkomplementation durch Prof. Dr. Armin Ensser (Erlangen) hergestellt [Toptan et al., 2010a]. Hierfür wurde das Virusgenom in Cosmid-Bibliotheken kloniert und überlappende Cosmide wurden in permissive Zellen kotransfiziert. Dabei wurden die einzelnen Segmente im Bereich der Überlappungen durch homologe Rekombination zusammengefügt und somit konnte das Virusgenom wieder rekonstituiert werden. Da in dieser Methode die Überlappungsbereiche für eine einwandfreie Rekombination unverändert bleiben müssen, eine hohe Anzahl an Rekombinationen zu instabilen und mutierten Produkten führt [van Zijl et al., 1988] und nur eine begrenzte Klonierungskapazität zur Verfügung steht, wurde diese Methode zur Nutzung von BACs weiterentwickelt.

BACs sind von bakteriellen Fertilitätsplasmiden (F-Plasmid) abgeleitet. Diese können Fremd-DNA von bis zu 300.000 bp aufnehmen, bleiben in *E. coli* unter Nutzung eines Antibiotika-Resistenzgens stabil erhalten und sind einfach zu handhaben und zu manipulieren. Mini-F-Plasmide sind auf ein Minimum ihrer genetischen Information reduziert, behalten aber die Fähigkeit zur autonomen Replikation durch ihren plasmidischen Replikationsursprung. Sie sind dafür verantwortlich, dass diese BACs maximal in zwei Kopien in der Zelle vorliegen [Shizuya et al., 1992]. Erstmals wurde das komplette Genom eines Herpesvirus im Fall des Murinen Cytomegalovirus als infektiöses BAC kloniert [Messerle et al., 1997]. Virale Genome ließen sich dadurch wesentlich einfacher verändern. Mini-F-Sequenzen können in eine nicht codierende Region des Virusgenoms mit flankierenden homologen DNA-Sequenzen eingebracht werden. Über homologe Rekombination in permissiven eukaryonten Zellen wurden die mini-F-Sequenzen an die gewünschte Stelle inseriert. Nach Isolierung aus den Zellen wurde das mutierte Virusgenom in geeignete Bakterienzellen durch Elektroporation eingebracht [Brune et al., 2000; Wagner et al., 2002]. Im Anschluss kann die zirkuläre BAC-DNA in permissive eukaryonte Zellen zur Virusvermehrung transfiziert werden. Zur Vermeidung unerwünschter homologer Rekombination wurden Bakterienstämme verwendet, denen das Protein Recombination A (RecA) fehlt. RecA sorgt während der Rekombination für die Paarung und Stranginvasion der homologen DNA. Mutationen in diesem Bereich reduzieren die Rekombinationshäufigkeit um den Faktor 10^5 [Cox, 2007]. Für eine gezielte Mutagenese in Bakterien wurde das *recombinogenic engineering* (*Recombineering*) verwendet. *Recombineering* beruht auf der homologen Rekombination von DNA-Fragmenten mit ca. 50 bp in *E. coli*. Ab einem homologen Bereich von 20 bp ist eine derartige Rekombination möglich; eine hohe Effizienz ist ab 36 bp gegeben [Datsenko und Wanner, 2000]. Die homologe Rekombination kann durch die Phagenproteine RecE/RecT von Rac-Prophagen [Zhang et al., 1998] oder durch die Red-Proteine des Bakteriophagen λ erreicht werden [Muyrers et al., 1999]. Den Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Rekombination durch die Gene *exo*, *beta* und *gam* aus dem Bakteriophagen λ zugrunde. Das *exo*-Gen codiert für eine Exonuklease, die 3'-Überhänge erzeugt, das *beta*-Genprodukt ist ein Einzelstrang-bindendes Protein, das die Anlagerung komplementärer DNA-Einzelstränge fördert und so einen Strangaustausch vermitteln kann. Das *gam*-Genprodukt inhibiert die recBCD-Nuklease, damit der Abbau der eingebrachten linearen DNA verhindert wird. Die drei Gene liegen als einfache Kopie im Genom von *E. coli* vor. Ihr γ *pL*-Promotor wird von einem temperatursensitiven Repressor reguliert. Bei 32°C ist der Repressor aktiv. Wenn die Temperatur für 15 min auf 42°C angehoben wird, wird die Rekombinationsfunktion transient unterstützt [Lee et al., 2001]. Im Fall des

HVS BACs C488 [Toptan et al., 2010a] befindet sich die mini-F-Sequenz im Leserahmen von *ORF14* (*IE14*) [Abb. 2.2]. *ORF14* ist für die Replikation und Transformation nicht essentiell [Knappe et al., 1997]. Das Produkt einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) des ins Genom einzubringenden Konstrukts enthält eine Kassette aus Transgen und Selektionsmarker und homologe Sequenzbereiche. Die homologen Bereiche vor und hinter der Kassette sind zur Insertion in das virale Genom notwendig. Der Selektionsmarker wird benötigt, damit die Produkte der erfolgreichen Rekombination selektiert werden können, und er wird mit Hilfe des zweiten Rekombinationsschritts der *En passant*-Mutagenese komplett aus dem BAC entfernt [Tischer et al., 2006]. Die *En passant*-Mutagenese beruht auf einer Red-vermittelten homologen Rekombination in zwei Schritten. Per PCR wird im ersten Schritt eine Schnittstelle für die Homing-Endonuklease I-SceI an das Ende des Selektionsmarkers amplifiziert. Beide Elemente werden zusätzlich von einer homologen Sequenz flankiert, die Teil des Gens vor dem Selektionsmarker sein kann. Diese I-SceI-Endonuklease, die ursprünglich von Introns in Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* codiert wird [Jacquier und Dujon, 1985], wird in diesem Fall zusammen mit den Red-Genen induziert, so dass die homologe Rekombination effizient stattfinden kann. Durch diese Methode können große Deletionen, Punktmutationen und Sequenzen an einer spezifischen Stelle schnell und effizient eingefügt werden [Tischer et al., 2006]. Zudem kann das Produkt durch erneutes Einfügen eines Konstrukts mit Selektionsmarker und I-SceI-Schnittstelle weiter verändert werden. Dabei bleiben keinerlei operationale Sequenzen wie Marker- oder Resistenzgene zurück, so dass sekundäre unerwünschte Effekte vermieden werden können.

2.3 Gegen ErbB2 gerichteter chimärer T-Zell-Rezeptor

2.3.1 T-Zell-Rezeptor-Komplex und Signalwege

Der T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) befindet sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Bei 95 % der T-Zellen besteht dieser aus den Ketten α und β , nur 5 % der T-Lymphozyten tragen einen $\gamma\delta$ -TCR [Murphy, 2011]. Die beiden TCR-Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden ein Heterodimer. Jede dieser Ketten besteht aus einer variablen, einer konstanten, einer transmembranären und einer cytoplasmatischen Domäne. Die variable Domäne erkennt die Antigene und wird durch das Rearrangement von verschiedenen Genabschnitten gebildet, die sich in variabel (V), divers (D) und Verbindungsstücke (*joining*, J) unterteilen [Gascoigne et al., 2001; Rudolph et al., 2006; Murphy, 2011].

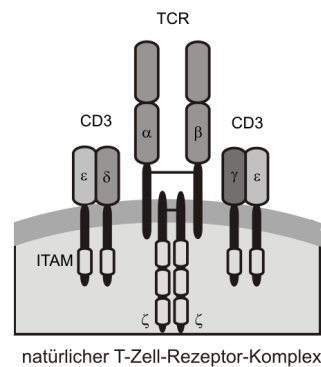


Abb. 2.3: Natürlicher $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-Komplex. Dargestellt ist ein in der Zellmembran eingelagerter natürlicher $\alpha\beta$ -TCR-Komplex mit seinen Untereinheiten.

Die große Diversität der TCR-Moleküle ermöglicht die Erkennung vieler verschiedener Antigene. Diese Antigene werden von Haupthistokompatibilitätskomplexen (*Major histocompatibility complex*, MHC) auf antigenpräsentierenden Zellen präsentiert [Huang et al., 2012]. Auch wenn die Antigen-Bindestelle nur eine geringe Affinität zum Liganden aufweist, kann das Antigen effizient erkannt werden, da gleichzeitig viele TCR-Moleküle die Zielzelle binden. TCRs der cytotoxischen $CD8^+$ -T-Lymphozyten erkennen in der Regel Antigen-MHC-I-Komplexe und TCRs der $CD4^+$ -T-Helferzellen Antigen-MHC-II-Komplexe [Gascoigne et al., 2001; Murphy, 2011]. Der $\alpha\beta$ -TCR ist auf der Oberfläche der T-Lymphozyten mit den invarianten Ketten von CD3 zusammengelagert, zu denen zwei Heterodimere aus $\delta\epsilon$ und $\gamma\epsilon$ und das $\zeta\zeta$ -Homodimer gehören. Diesen gesamten Komplex nennt man TCR-Komplex [Abb. 2.3]. Die einzelnen Untereinheiten werden über einmalige hochspezifische polare Interaktionen zwischen Transmembrandomänen zusammengehalten [Call et al., 2002; Call und Wucherpfennig, 2005]. Die Signalübertragung läuft über die Tyrosin-basierten Immunrezeptor-Aktivierungsmotive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) [Abram und Lowell, 2007; Ivashkiv, 2009] der CD3-Ketten, da die TCR- $\alpha\beta$ -Ketten nur einen sehr kurzen cytoplasmatischen Bereich aufweisen, der keine eigenständige Signaltransduktion erlaubt. Die Tyrosin-Reste in diesen Motiven werden nach der Bindung des TCR an den Antigen-MHC-Komplex durch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Familie phosphoryliert, wodurch andere Moleküle rekrutiert und die Signalkaskade initiiert werden [Janeway, 1992; Kersh und Allen, 1996; Kersh et al., 1998; Gascoigne et al., 2001]. Diese Reaktion wird als T-Zell-Aktivierung bezeichnet [Abb. 2.4]. Im ersten Schritt der TCR-Signalkaskade wird Fyn [Cooke und Perlmutter, 1989] durch die Tyrosinphosphatase CD45 dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Fyn phosphoryliert die ITAMs an CD3 und der ζ -Kette [Filby et al., 2007], wodurch Bindestellen z.B. für *Zeta-Chain Associated Protein Kinase*

of 70 kDa (ZAP-70) freigelegt werden. Durch die Bindung kommt ZAP-70 in die räumliche Nähe der *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* Lck [Veillette et al., 1991], die zuvor durch CD4 oder CD8 rekrutiert und aktiviert wurde. Lck phosphoryliert sowohl die ITAMs an CD3 und der ζ -Kette, als auch ZAP-70. ZAP-70 verstärkt nach der ITAM-Bindung den Signalweg [Chan et al., 1994], wird durch Adaptorproteine wie z.B. den *linker for activation of T cells* (LAT) in die Nähe der Phospholipase-C γ gebracht und ist im Folgenden an deren Aktivierung beteiligt. Die Aktivierungskaskade führt zur Induktion der Transkription von Effektor-Genen im Zellkern [Lin und Weiss, 2001]. Die Folgen sind zelluläre Proliferation, Differenzierung, Cytokinproduktion oder Apoptose, sowie die T-zelluläre, spezifische Cytotoxizität.

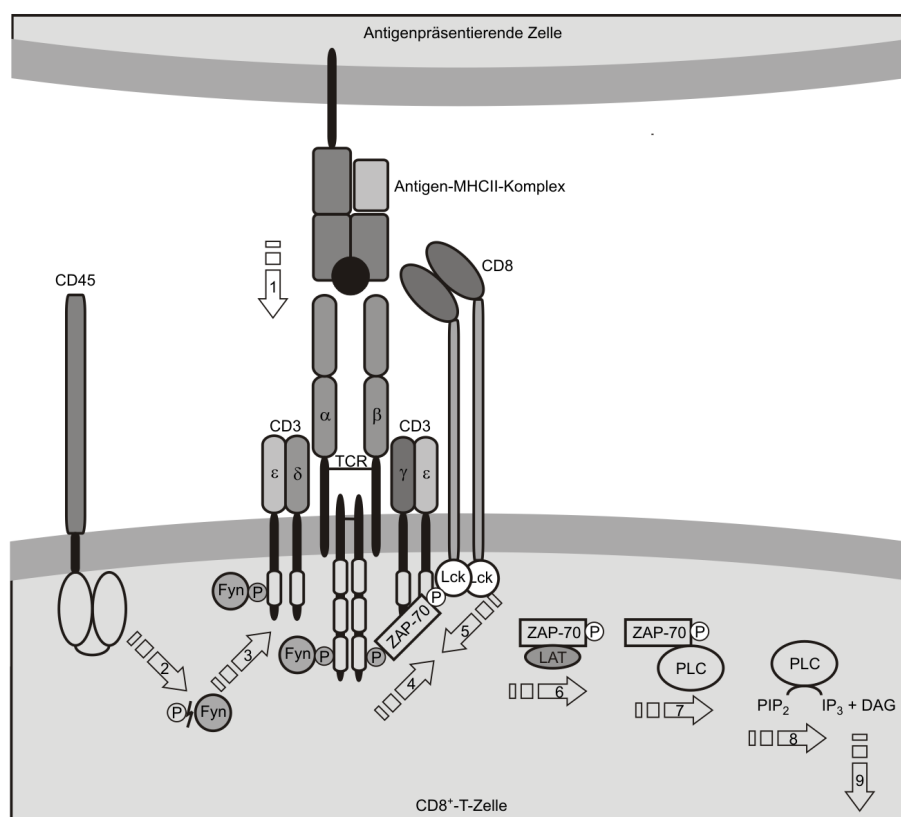


Abb. 2.4: Signalweg nach Aktivierung des TCR-Komplexes durch einen Antigen-MHC-Komplex.

1. Erkennung und Bindung des Antigen-MHC-Komplexes durch den TCR; 2. Dephosphorylierung von Fyn durch CD45; 3. Phosphorylierung von ITAMs durch Fyn; 4. Rekrutierung von ZAP-70; 5. Phosphorylierung von ZAP-70 durch Lck; 6. Bindung von ZAP-70 durch LAT; 7. Aktivierung von Phospholipase C (PLC) durch ZAP-70; 8. Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG); 9. weiterführende Signalkaskade.

2.3.2 Das Zielantigen ErbB2

Der ErbB2-Rezeptor [Abb. 2.5] ist ein Mitglied der ErbB-Familie der Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF), einer Familie von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bestehend aus vier Untergruppen: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4 [Holbro et al., 2003]. Diese Rezeptoren regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und Entwicklung [Schlessinger, 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001; Holbro et al., 2003; Marmor et al., 2004]. Bei ErbB2-Defekt-Mäusen war die Entwicklung von Herz und Nervensystem gestört [Burden und Yarden, 1997].

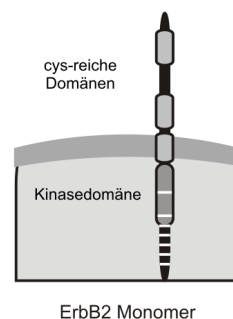


Abb. 2.5: ErbB2-Monomer. Auf der cytoplasmatischen Seite sind durch helle Streifen die verschiedenen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen eingezeichnet. Diese werden entweder durch Src-Kinasen (Tyr877) oder durch Autophosphorylierung (Tyr1023, Tyr1112, Tyr1139, Tyr1196, Tyr1221/2, Tyr1248) aktiviert.

Die Mitglieder der ErbB-Familie besitzen eine einzelne Transmembran-Region und eine cytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne. Mit Ausnahme von ErbB2 ist für alle anderen Mitglieder eine Ligandenbindestelle definiert. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, bevorzugt mit ErbB2 [Ullrich und Schlessinger, 1990]. Die Bildung von Dimeren führt zu einer Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne und somit zu Autophosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten der cytoplasmatischen Domäne. Die entstehenden Bindestellen werden von nachgeschalteten Effektoren besetzt. Durch ErbB2 werden u.a. die durch Ras aktivierte Mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAPK), die durch Proteinkinase B (Akt) regulierte Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die durch Proteinkinase C aktivierte Phospholipase C stimuliert [Pawson und Scott, 1997; Olayioye et al., 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001].

ErbB2-Rezeptoren sind in der Entstehung vieler Typen humaner Tumoren involviert. Eine Überexpression konnte u.a. in humanen Malignomen der Mammæ, Ovarien, der Harnblase

und des Magens nachgewiesen werden [Berger et al., 1988; Slamon et al., 1989; Lemoine et al., 1991; Sauter et al., 1993]. Überexprimiertes ErbB2 ist wichtig im Hinblick auf die Proliferation von Tumorzellen und ist mit einer schlechten klinischen Prognose u.a. bei Mammakarzinom-Patientinnen assoziiert [Hynes und Stern, 1994]. Seit dieser Erkenntnis gilt ErbB2 als wesentliches therapeutisches Ziel, z.B. durch den Einsatz von antagonistischen Antikörpern [Lane et al., 2000; Yakes et al., 2002], kleinen Kinaseinhibitoren [Moasser et al., 2001; Motoyama et al., 2002], Komponenten, die einen ErbB2-Abbau bewirken [Basso et al., 2002; Münster et al., 2002], und Einzelkettenantikörpern (*single chain antibody fragment of variable region*, scFv). Die scFv-Antikörper bewirken durch das Zurückhalten im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Tumorzelle die funktionelle Inaktivierung von ErbB2 [Neve et al., 2000]. Der Verlust von ErbB2 auf der Oberfläche der SKBR3-Zellen führte zu einer Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von ErbB2 und ErbB3 und somit zu einem signifikanten Abfall der Aktivität des PI3K- und Ras/MAP-Kinase-Signalweges. Im Ergebnis blieben die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus stehen [Neve et al., 2000]. Dasselbe Antikörperfragment scFv-(FRP5) wurde in den vorliegenden Versuchen verwendet und in einen rhadinoviralen HVS-Vektor durch *En passant*-Mutagenese integriert [Tischer et al., 2006].

Die Steigerung der ErbB2-Aktivität in Tumorzellen kann durch eine autokrine Sekretionsschleife, in die eine Überexpression von Liganden und Rezeptoren in den Tumorzellen involviert ist, oder durch eine parakrine Produktion der ErbB-Liganden durch Stromazellen stattfinden [Salomon et al., 1995]. Als weitere Möglichkeit wird eine konstitutive Rezeptoraktivität angenommen [Lonardo et al., 1990]. Mutationen wurden im ErbB2-Gen nur selten beschrieben. Die Überexpression von ErbB2 in 20 bis 30 % der Mamma- und Ovarialkarzinome wird durch Genamplifikation bedingt. Diese ist infolge der Herunterregulation von p21^{Waf1} mit einer Chemoresistenz, einer Apoptose-Resistenz und einer schlechten Prognose verbunden [Yu et al., 1998]. Der onkogene Effekt basiert auf der starken basalen Autophosphorylierung von ErbB2 [Lonardo et al., 1990]. Hohe Expressionsspiegel führen zu einer konstitutiven Homodimerisierung, die in Zellkulturmodellen eine transformierende Wirkung zeigte [Di Fiore et al., 1987; Di Marco et al., 1990]. Bei Heterodimeren mit ErbB1 sorgt ErbB2 für eine geringere Endocytose [Sorkin et al., 1993; Baulida et al., 1996], eine Reduzierung des lysosomalen Abbaus [Lenferink et al., 1998; Worthylake et al., 1999] und dadurch zu einer längeren Ligandenbindung auf der Oberfläche der Zelle [Karunagaran et al., 1996]. ErbB-Rezeptortyrosinkinasen werden auch durch ihre intrazelluläre Lokalisation reguliert. ErbB2, ebenso wie ErbB1 und ErbB4, sind in membranären Mikrodomänen (Caveolae) angereichert [Anderson, 1998; Schlegel et al., 2000].

Caveolae sind Cholesterin-reiche Einbuchtungen der Plasmamembran und somit spezielle *lipid rafts* mit einer typischen Zusammensetzung an Proteinen und Lipiden. Das Hauptprotein ist Caveolin. Caveolin-1 interagiert mit den ErbBs, wodurch es zu einer Verminderung ihrer Kinasaktivität kommt [Couet et al., 1997; Engelman et al., 1998]. Entsprechend bewirkt Caveolin einen tumorsuppressiven Effekt [Galbiati et al., 1998; Razani et al., 2001].

2.3.3 Chimäre T-Zell-Rezeptoren

Chimäre T-Zell-Rezeptoren (cTCR) oder chimäre Antigenrezeptoren (CAR) sind Konstrukte aus monoklonalen Antikörpern und Proteindomänen zur Signalweiterleitung in T-Lymphozyten. Sie werden auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert und ermöglichen eine antigenspezifische, MHC-unabhängige cytotoxische Wirkung. Die MHC-unabhängige Wirkung ist von entscheidender Bedeutung, wenn die MHC-Expression in Tumoren durch Veränderungen in ihrer Prozessierung oder Präsentation herunterreguliert ist [Finke et al., 1999; Sadelain et al., 2003; Zippelius et al., 2004; Seliger, 2008]. Die in CARs bzw. cTCRs verwendeten Antikörper-Domänen sind meistens gegen tumorspezifische Oberflächenantigene gerichtet [Tab. 2.1]. Diese Strategie vereint die zelluläre und humorale Seite der Immunantwort. Sie stellt eine wesentliche Methode der adoptiven Zelltherapie zur Behandlung von Tumoren dar [Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 2008].

Tab. 2.1: Zielmoleküle für cTCR-/CAR-basierte Immuntherapien. nach Maher, 2012.

Molekül	Tumor	Antigen	Referenz
CD19	B-Zellen	Protein	Cooper et al., 2003; Kochenderfer et al., 2009; Porter et al., 2011
ErbB2	Mamma, Knochen, Prostata, Kleinhirn, Gehirn	Protein	Moritz und Groner, 1995; Altenschmidt et al., 1996; Chmielewski et al., 2004; Pinthus et al., 2004
TAG72	Magen-Darm	Kohlenhydrat	Hombach et al., 1997
MUC1	Mamma, Ovar	stark glykosyliertes Protein	Wilkie et al., 2008
GD3	Haut	Gangliosid	Yun et al., 2000

Der erste CAR entstand durch die Fusion eines scFv mit der CD3 ζ -Kette [Eshhar et al., 1993], da diese Kette für die T-Zellaktivierung zentral wesentlich ist [Letourneur und Klausner 1991; Irving et al., 1993]. Die Gruppe der CARs der ersten Generation besteht aus der Antigen-erkennenden extrazellulären Domäne mit einer scFv-Kombination der variablen Regionen der schweren und leichten Kette eines Antikörpers, der Transmembran-Domäne und der intrazel-

lulären Domäne [Abb. 2.6]. Die extrazelluläre Domäne sitzt auf einem kurzen Peptid-Linker aus Glycin oder Serin und ist somit flexibel. Die intrazelluläre Domäne besteht meist aus der ζ -Kette des TCR-Komplexes mit seinen ITAMs [Eshhar et al., 1993; Eshhar et al., 1996]. Die CAR-Moleküle haben ein Molekulargewicht von ungefähr 28 kDa [Holliger und Hudson, 2005]. CARs der ersten Generation führen zu einer tumorgerichteten Cytotoxizität der T-Lymphozyten [Tab. 2.2] [Cartellieri et al., 2010].

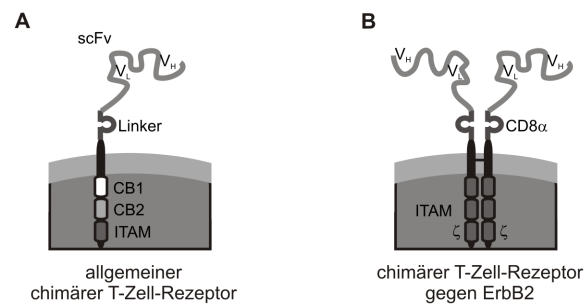


Abb. 2.6: Chimärer T-Zell-Rezeptor. **A** Dargestellt ist ein allgemeiner chimärer T-Zell-Rezeptor. Die costimulatorische Bindungsdomäne (CB) sind von der Generation und Verwendung des chimären T-Zell-Rezeptors abhängig. **B** Der verwendete cTCR besteht aus einer ErbB2-bindenden scFv-Domäne, einem CD8 α -Linker und der ζ -Ketten mit ihren ITAMs.

Die zweite Generation wurde durch eine zusätzliche intrazelluläre costimulatorische Bindungsdomäne (CD28, CD134, CD137 oder ICOS) zwischen der transmembranen Domäne und den ITAMs ergänzt. Durch diesen Zusatz kommt es zu einer gesteigerten Proliferation, Cytokinsekretion, Resistenz gegen regulatorische T-Zellen und *in vivo*-Persistenz [Tab. 2.2].

Tab. 2.2: Generationen von chimären T-Zell-Rezeptoren. Dargestellt sind die drei Generationen der cTCR mit ihren intrazellulären Bestandteilen (CB: costimulatorische Bindungsdomänen) nach Cartellieri et al., 2010.

	ITAM-Kette	CB1	CB2	Auswirkung
1. Generation	vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	Cytotoxizität \uparrow
2. Generation	vorhanden	CD28/CD134 CD137/ICOS	nicht vorhanden	Cytotoxizität \uparrow Proliferation \uparrow Cytokinsekretion \uparrow Resistenz \uparrow <i>In vivo</i> -Persistenz \uparrow
3. Generation	vorhanden	CD28	CD134/CD137	Cytotoxizität $\uparrow\uparrow$ Proliferation $\uparrow\uparrow$ Cytokinsekretion $\uparrow\uparrow$ Resistenz $\uparrow\uparrow$ <i>In vivo</i> -Persistenz $\uparrow\uparrow$

Diese Eigenschaften sind bei der dritten Generation CARs noch ausgeprägter. In diesen CARs ist unterhalb der CD28-Domäne zusätzlich eine CD134- oder CD137-Domäne integriert [Cartellieri et al., 2010]. Eine Linker-Region zwischen der Binde- und der Transmembrandomäne erhöht die Flexibilität des Rezeptors und seine Zugängigkeit zum Bindungsmotiv, die sonst unter anderem durch die ausgeprägte Glykokalyx der T-Zellen nicht möglich wäre [Moritz und Groner, 1995].

Für den Gentransfer der chimären Antigenrezeptoren in T-Lymphozyten wurden verschiedene Möglichkeiten erprobt. Lentivirale [Cavalieri et al., 2003; Huang et al., 2008], konventionell retrovirale [Sauce et al., 2002] oder Retrotransposon-Systeme [Singh et al., 2008; Manuri et al., 2010] wurden verwendet oder eine Elektroporation von DNA [Serrano et al., 2006] oder mRNA [Birkholz et al., 2009] durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass der virale Gentransfer aufgrund der Transferrate und Langzeitexpression zu bevorzugen ist. Allerdings unterliegt die längerfristige Expression bei integrierenden Vektoren häufig einer sekundären Inaktivierung bzw. dem *Silencing*. CARs werden auch zu der Behandlung von Virusinfektionen eingesetzt [Roberts et al., 1994; Mitsuyasu et al., 2000; Full et al., 2010] oder bei Autoimmunkrankheiten nach der Expression auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen [Elinav et al., 2008; Elinav et al., 2009; Hombach et al., 2009].

2.4 Induziert exprimierte Transgene

2.4.1 Tetracyclin-Doppelschalter-System

Das ursprüngliche Tetracyclin-(Tet)-System ist das sogenannte Tet-Off-System. Hierbei sorgt die Zugabe des Antibiotikums Tet in das Kulturmedium dafür, dass das Gen in der regulatorischen Kasse reprimiert, nicht abgelesen und somit nicht exprimiert wird [Gossen und Bujard, 1992]. In dieser Arbeit wurde für verschiedene Fragestellungen eine besondere Variante des Tet-On-Systems verwendet, bei dem im Gegensatz zum Tet-Off-System die Transkription durch Tet-Gabe induziert wird [Abb. 2.7]. Entscheidend für die Funktionalität beider Systeme sind die Bestandteile der regulatorischen Kasse. Dazu gehören die Tet-Operatoren (TetO), der Tet-abhängige Transsilencer (tTS) und der (reverse) Tet-abhängige Transaktivator (rtTA). Das Prinzip beruht auf der natürlichen Resistenzbildung gegen Tet in gramnegativen Bakterien. Verantwortlich dafür sind der Tet-Antiporter (TetA) und der Tet-Repressor (TetR). Der Tet-Antiporter ist ein Protonen-Antiporter in der Membran, der Protonen in die Zelle und Tet aus der Zelle herauspumpt. Dieser wird erst dann exprimiert, wenn sich Tet in der Umgebung

der Zelle befindet. Die Repression wird durch TetR vermittelt. Der dimere TetR bindet in Abwesenheit von Tet an die TetOs, wodurch die Expression des Repressors selbst und von TetA minimiert wird. Wenn Tet in die Zelle diffundiert, wird es von TetR gebunden, der sich daraufhin von den TetOs löst und die Synthese vom TetA ermöglicht [Gossen et al., 1995; Berens und Hillen, 2004].

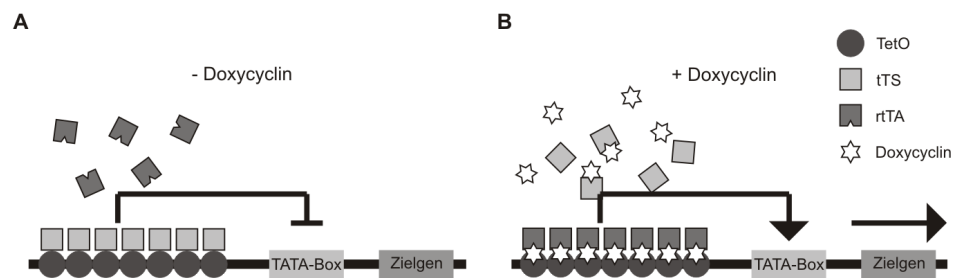


Abb. 2.7: Tet-On-System. **A** In Abwesenheit von Tet oder Doxycyclin (Dox) bindet der Tet-abhängige Transsilencer (tTS) an die Tet-Operatoren (TetO), so dass keine Expression des Zielgens mehr stattfinden kann. **B** Tet oder Dox bindet an den reversen Tet-abhängigen Transaktivator (rtTA). Der Komplex verdrängt den Silencer und bindet selbst an die Tet-Operator, was zu einer Expression der Zielgene führt.

Damit das System auch in eukaryonten Zellen angewendet werden kann, wurde der prokaryonte TetR mit der negativ geladenen, C-terminalen Aktivierungs-Domäne des viralen Transkriptionsaktivators VP16 aus HSV-1 (Tet-abhängiger Transaktivator, tTA) fusioniert. Als Folge musste auch ein tTA-aktivierbarer Promotor konstruiert werden. Eine starke Aktivierung der Transkription konnte durch multimere TetOs stromaufwärts einer Minimalpromotorsequenz erreicht werden [Gossen und Bujard, 1992]. Die Genexpression ist weiterhin stark abhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Tet und Tet-Derivaten, wie z.B. Doxycyclin (Dox) [Degenkolb et al., 1991].

Für die Weiterentwicklung des Tet-Off-Systems zum hier verwendeten Tet-On-System [Abb. 2.7] wurden vier Aminosäuren im TetR-Bereich ausgetauscht. Dadurch wurde der Transaktivator zum rtTA, der nur noch in Anwesenheit von Tet an den Operator bindet [Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995]. Durch Screening-Verfahren wurden Varianten mit einer hohen Induktionsrate, einer hohen Dox-Sensitivität und einer geringen Basalexpression gefunden. Zusätzlich wurde die Codonverwendung für humane Zellen optimiert (rtTA2^S-M2) [Urlinger et al., 2000]. Die Basalexpression konnte durch die Fusion von TetR mit der humanen Krüppel-assoziierten Box der Kox-1-Domäne reduziert werden, wodurch ein tTS entstand [Ryu et al., 2001]. Dieser Erneuerung führte zu einem Doppelschalter-System, in dem tTS und rtTA bicistronisch über ein IRES-Element exprimiert werden. In Abwesenheit von Dox sorgt tTS für

eine stringente Transkriptionssuppression, während rtTA in Anwesenheit von Dox die Transgenexpression ermöglicht [Bornkamm et al., 2005].

Durch die Möglichkeit, Gene spezifisch ein- und auszuschalten, eignen sich die Tet-Regulationssysteme für die Gentherapie. Tet kann problemlos durch die Membranen der untersuchten Zielzellen diffundieren und ist sogar in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta zu passieren. Infolge der hohen Bindekonstante für den Operator (etwa 10^{11} M^{-1}) und der sehr geringen Affinität für unspezifische DNA ($< 10^5 \text{ M}^{-1}$) ist die benötigte Menge des meist genutzten Induktors Dox mit 10 bis 1.000 ng/ml sehr gering. Diese Konzentration liegt deutlich unterhalb der toxischen Wirkung von Dox (HeLa-Zellen: $> 3 \text{ } \mu\text{g/ml}$) [Gossen et al., 1995]. Für den Einsatz des Tet-Doppelschalter-Systems sind Vektoren mit einer hohen Klonierungskapazität notwendig.

2.4.2 Doxycyclin-induzierte Apoptose

Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet [Kerr et al., 1972] und beschreibt im Gegensatz zur Nekrose den aktiv induzierten Zelltod. Dieses Selbstmordprogramm der Zelle wird sowohl während der Entwicklung eines Organismus als auch in adulten Geweben genutzt [Wyllie et al., 1980]. Viele Nervenzellen sterben durch Apoptose nach ihrer Entstehung im Rahmen der Anpassung an die Vernetzung. Durch die Kondensation des Chromatins beginnt die Zelle zu schrumpfen. Im nächsten Schritt kommt es zur Fragmentierung des Zellkerns und zum Zerfall der Zelle in apoptotische Vesikel. Diese werden von Makrophagen durch Phagocytose aufgenommen und abgebaut [Kerr et al., 1972; Saraste und Pulkki, 2000; Elmore, 2007].

Schlüsselproteine der Apoptose sind die Caspasen. Die Bezeichnung „Caspase“ leitet sich vom strukturellen Aufbau des aktiven Zentrums ab. Diese Enzyme tragen im aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein (Cystein-Proteasen) [Alnemri et al., 1996] und spalten die C-terminale Peptidbindung von Aspartat. Caspasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Initiator-Caspasen (u.a. Caspase 8 und 9) und Effektor-Caspasen (u.a. Caspase 3, 6 und 7) [Earnshaw et al., 1999]. Initiator-Caspasen können auf zwei verschiedenen Wegen durch limitierte Proteolyse aktiviert werden und dann die Effektor-Caspasen aktivieren. Der extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren (u.a. CD95 oder Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor) oder Caspase 8 initialisiert [Ashkenazi und Dixit, 1998; Boatright und Salvesen, 2003]. Der intrinsische Weg führt über die Mitochondrien zur Aktivierung der Caspase 9 [Boatright und Salvesen,

2003]. Pro-Caspase 3 wird entweder von Caspase 8 oder 9 durch limitierte Proteolyse zu Caspase 3 aktiviert. Caspase 3 spaltet u.a. Lamin oder die Proteinkinase C [Lazebnik et al., 1995; Voelkel-Johnson et al., 1995], die für DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Vesikelbildung der Plasmamembran wichtig ist [Sahara et al., 1999; Wolf et al., 1999; Sebbagh et al., 2001] und aktiviert die spezifische Caspase-aktivierte DNase durch Proteolyse ihres Inhibitors [Sakahira et al., 1998]. Außerdem ist Caspase 3 für die Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) verantwortlich [Lazebnik et al., 1994], die in dieser Arbeit als Apoptosenachweis per Westernblot dient. Der konzertierte Ablauf dieser Reaktionen führt in einer Signalkaskade zum programmierten Zelltod [Abb. 2.8] [Nuñez et al., 1998].

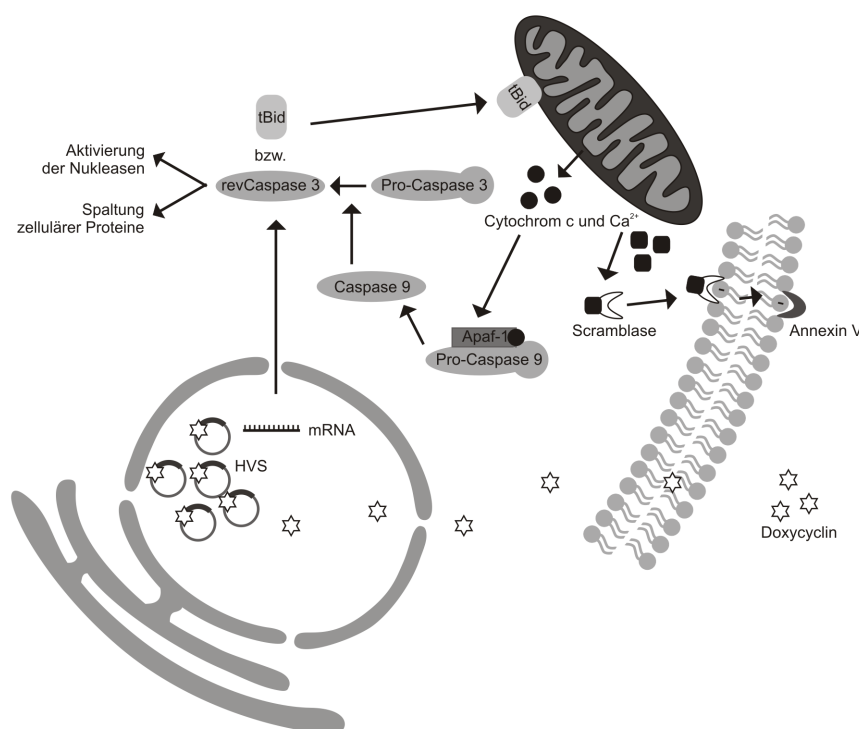


Abb. 2.8: Dox-induzierte Apoptose in Zellen mit rekombinantem HVS. Gelangt Dox in den Zellkern, bindet es dort mit rtTA an TetO und sorgt für die Synthese der mRNA für tBid oder die reverse Caspase 3. tBid integriert in die Mitochondrienmembran und führt zur Dimerisierung von Bax und Bak. Dieses Heteromer bildet einen Kanal, durch den Cytochrom c und Ca^{2+} ins Cytoplasma gelangt. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und aktiviert die Pro-Caspase 9. Diese führt eine limitierte Proteolyse der Pro-Caspase 3 durch. Als Effektor-Caspase leitet die reverse Caspase 3 die finalen Schritte der Apoptose ein. Ca^{2+} bindet an die Scramblase, die Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran befördert. Phosphatidylserin wird dort durch Annexin V erkannt.

In dieser Arbeit wurde zur Induktion der Apoptose die reverse Caspase 3 verwendet [Srinivasula et al., 1998a]. Der Unterschied zum Wildtyp der Caspase 3 besteht in der Anordnung der Untereinheiten und der Prozessierung vor der Faltung. Die endgültige Struktur imitiert

die Struktur des aktiven Wildtyp-Moleküls. Bei der reversen Caspase 3 wurde die kleine Untereinheit vor das Verbindungsstück der großen Untereinheit kloniert. Vor der Faltung in das aktive Protein kommt es nicht zu einer Trennung von großer und kleiner Untereinheit. Versuche zeigten, dass die apoptotische Wirkung der reversen Caspase 3 die Wirkung des Wildtyps deutlich übertraf [Srinivasula et al., 1998a].

Das cytosolische Protein *BH3 interacting domain death agonist* (Bid) ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie [Billen et al., 2009], deren Merkmal die spezifischen Bcl-2-Homologie-Domänen (BH) ist. Die Bildung von Homo- oder Heterodimeren ist möglich. Proteine der Bcl-2-Familie agieren als anti- oder proapoptotische Regulatoren [Adams und Cory, 1998]. Bid gehört zu den proapoptotischen Mitgliedern, die nur die BH3-Domäne enthalten [Billen et al., 2009]. Die Funktion von Bid steht näher am Anfang der apoptotischen Signalkaskade als die terminal wirkende Caspase 3. Nachdem Bid von der Caspase 8 gespalten und dadurch zum verkürzten Bid (*truncated Bid*, tBid) wird, transloziert es durch eine Interaktion mit Cardiolipin in die Mitochondrienmembran [Lutter et al., 2000]. Dort initiiert es eine Porenbildung durch die Aktivierung der Proteine Bax und Bak, in deren Folge Cytochrom c und Ca^{2+} freigesetzt werden [Gross et al., 1999; Heibein et al., 2000; Kuwana et al., 2002]. Cytochrom c bindet zusammen mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) [Adams und Cory, 2002]. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins [Srinivasula et al., 1998b] und somit zur Bindung von Apaf-1 an die Caspase-Rekrutierungsdomäne der Pro-Caspase 9 [Hu et al., 1998]. Die Folge ist die autolytische Aktivierung zur Caspase 9. Dieser aktive Komplex der Caspase 9 wird auch Apoptosom genannt [Zou et al., 1999]. In weiteren Schritten wird die Caspasen-Kaskade aktiviert [Abb. 2.8].

Außerdem bindet Ca^{2+} an die Scramblase, die dadurch aktiviert wird und nach Bindung an Phosphatidylserin auf der Innenseite der Cytoplasmamembran Phosphatidylserin in den periplasmatischen Raum transferiert [Sahu et al., 2007]. Durch diese Oberflächenveränderung bindet das extrazelluläre Matrixprotein Annexin V an Serin. Folglich kann auch die Bindung von Annexin V an Serin als Indikator für den Zelltod dienen [Abb. 2.8] [Koopman et al., 1994; Boersma et al., 2005].

In dieser Arbeit wurde die Induktion der Apoptose für verschiedene Fragestellungen untersucht. Die Tet-abhängige Expression von tBid und reverser Caspase 3 sollte spezifisch in humanen Hepatomzellen oder humanen T-Lymphozyten aktiviert werden. Dazu wurden Konstrukte mit den regulatorischen Kassetten des humanen Alpha-Fetoproteins oder des CD2 kloniert.

2.4.3 Zelltyp-spezifische Doxycyclin-Doppelschalter

Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein Polypeptid aus 591 Aminosäuren (68/70 kDa) und einer Asparagin-verknüpften (Asn233) Kohlenhydratkette [Yoshima et al., 1980; Lemire und Fausto, 1991; Mizejewski, 1997]. AFP ist ein meist monomeres sekretorisches Protein mit strukturellen und physiochemischen Eigenschaften ähnlich dem Albumin [Lazarevich, 1999]. Die genaue Funktion von AFP ist unklar. Es bindet und transportiert eine Reihe von Liganden wie Bilirubin, Fettsäuren, Retinoide, Steroide, Schwermetalle, Flavonoide, Phytoöstrogene, Dioxin und verschiedene Medikamente [Deutsch, 1991; Mizejewski, 2001; Terentiev und Moldogazieva, 2006]. Kurz nach der Geburt fällt der AFP-Spiegel um das 10^4 -fache ab. Die AFP-Synthese ist in Lebertumoren [Tatarinov, 1964] und Teratoblastomen [Abelev et al., 1967] stark erhöht.

AFP ist in der Onkologie ein wichtiger Tumormarker, seit Tatarinov AFP im Serum von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (*Hepatocellular carcinoma*, HCC) beschrieb [Tatarinov, 1964]. Die Korrelation zwischen AFP im Serum und HCC wurde mehrfach gezeigt [Abelev et al., 1963; Alpert et al., 1968; Purves et al., 1968; Smith und Todd, 1968; Alpert et al., 1971; Ruoslahti und Seppälä, 1971; McIntire et al., 1972]. Erhöhte AFP-Werte können ebenfalls bei Hepatitiden, Leberzirrhosen und testikulären und ovariellen Tumoren auftreten.

Das AFP-Gen besitzt stromaufwärts eine regulatorische Region von 7 kb. Diese besteht aus einem gewebespezifischen Promotor, zwei unabhängigen Enhancern und zwei Silencerregionen. Die Enhancerregionen befinden sich bei -4,0 bis -3,7 kb und bei -3,7 bis -3,3 kb vor dem Promotor. Im proximalen Promotor befindet sich die Bindestelle für HNF1 (*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A*). HNF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Leberzellen stark exprimiert wird und in die Expressionsregulation vieler leberspezifischer Gene involviert ist [Courtois et al., 1987]. Die Silencer der AFP-regulatorischen Kasette befinden sich zwischen -1.822 bis -951 bp und -402 bis -169 bp vor dem Promotor. Der distale Silencer ist stärker, er hemmt die Aktivität homologer und heterologer Enhancer, hat bis jetzt aber keinen bekannten Einfluss auf die AFP-Promotorfunktion [Nakabayashi et al., 1991].

CD2 ist ein Zelladhäsionsmolekül mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer einzelnen Transmembran-Region und einer positiv geladenen prolinreichen Cytoplasmadomäne, die hoch konserviert ist [Moingeon et al., 1989; Davis und van der Merwe, 1996]. CD2 befindet sich auf der Oberfläche von Thymozyten, den Vorläuferzellen von T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und auf reifen T-Zellen. Der bekannteste Ligand ist LFA-3, der auf antigen-

präsentierenden Zellen und teilweise auch auf Makrophagen exprimiert wird und in die Signaltransduktion und Zelladhäsion involviert ist [Barbosa et al., 1986; Wallich et al., 1998]. Die Interaktion von CD2 mit LFA-3 steigert die durch die T-Zell-Antigenerkennung induzierte Signaltransduktion beachtlich [Springer et al., 1987; Moingeon et al., 1989; Bierer et al., 1989]. Eine Überexpression von CD2 wurde bei der T-zellulären akuten lymphatischen Leukämie und bei T-Zell-Lymphomen nachgewiesen. Für HVS-transformierte T-Lymphozyten ist außerdem die CD2-Hyperreaktivität typisch, die von der CD2-LFA-3-Interaktion abhängig ist [Mittrücker et al., 1992]. Die Enhancer-Promotor-Regionen aus den Genen für AFP und CD2 wurden zur Zelltyp-spezifischen Expression der Tet-Transregulatoren eingesetzt.

2.4.4 Glykoprotein 130

Das Glykoprotein gp130 hat eine Molekularmasse von ca. 130 kDa. Die humane Variante wurde erstmals 1990 kloniert [Hibi et al., 1990] und die murine Variante 1992 [Saito et al., 1992]. Die beiden Proteine haben eine Aminosäurehomologie von 76,8 %. Die Expression findet in der Maus in vielen Organen (Herz, Nieren, Milz, Leber, Lunge, Plazenta und Gehirn) statt [Saito et al., 1992]. Die Deletion des gp130-Gens führt bei Mäusen zu einer embryonalen Letalität nach 12,5 Tagen [Yoshida et al., 1996] und zeigt, dass gp130 eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Hämatopoese, Zellüberleben und Wachstum spielt [Jones et al., 2011].

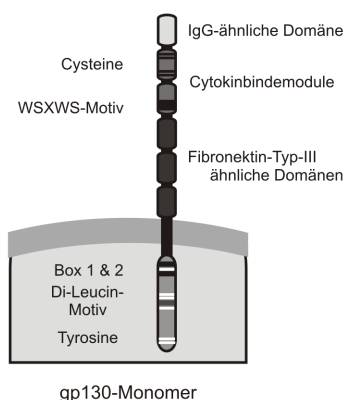


Abb. 2.9: gp130-Monomer. Dicker schwarzer Balken: WSXWS-Motiv; dünne schwarze Balken: Cysteine; dünne weiße Balken: Tyrosine; dicker grauer Balken: Di-Leucin-Motiv.

Das gp130-Protein ist ein Transmembranprotein und besitzt das Aminosäuremotiv WSXWS, das eine korrekte Proteinfaltung und Ligandenbindung gewährleistet [Abb. 2.9]. Wegen dieses Motivs und wegen seiner Funktion als Bestandteil von Cytokinrezeptoren wird es zu den Typ I-Cytokinrezeptoren gezählt. Das Protein gp130 bildet eine Untereinheit verschiedener Signal-

komplexe und ist für die Weiterleitung der Signale einiger Cytokine in die Zelle verantwortlich. Zu den Cytokinen, die mit Hilfe von gp130 wirken, gehören IL-6, IL-11, Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1), ziliärer neurotropher Faktor (CNTF) und Oncostatin-M (OSM) [Yoshida et al., 1996; Betz et al., 1998]. Alle diese Cytokine wirken über einen zwei- oder dreigliedrigen Rezeptorkomplex. Hierbei werden Signale über Homodimerisierung (IL-6, IL-11) oder Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIFR (LIF, CT-1, CNTF, OSM) oder dem OSMR (OSM) weitergegeben [Heinrich et al., 2003].

Tab. 2.3: IL-6-Typ-Cytokinrezeptor-Komplexe. nach Heinrich et al., 2003.

Cytokin	1. Rezeptor- untereinheit	2. Rezeptor- untereinheit	α -Rezeptor	Referenz
IL-6	gp130	gp130	IL-6R	Murakami et al., 1993
IL-11	gp130	gp130	IL-11R	Yin et al., 1993
	gp130	n.d.		Neddermann et al., 1996
LIF	LIFR	gp130		Gearing et al., 1992
CT-1	LIFR	gp130	vorhanden	Pennica et al., 1995
CNTF	LIFR	gp130	CNTF-R	Davis et al., 1993
OSM	LIFR	gp130		Gearing et al., 1992
	OSMR	gp130		Ichihara et al., 1997

Das Protein gp130 besitzt keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität. Stattdessen werden Tyrosinreste nach Komplexierung mit anderen Proteinen phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zur Assoziation mit Januskinasen und *signal transducers and activators of transcription*-Transkriptionsfaktoren (STAT-Faktoren). Insbesondere wird STAT3 aktiviert, was zu der Expression vieler nachgeschalteter Gene führt [Brivanlou und Darnell, 2002; Levy und Darnell, 2002; O'Shea et al., 2002]. Weitere mögliche Signalwege aktivieren Ras und MAPK. In verschiedenen Zelllinien wurde eine Lokalisation von gp130 in Plasmamembran-Mikrodomänen wie *lipid rafts* und Caveolae gefunden [Koshelnick et al., 1997; Podar et al., 2002; Sehgal et al., 2002]. Diese Lokalisation könnte die Voraussetzung für spezielle Signalfunktionen des Rezeptors sein.

In diesem Projekt wurde IL-6 dazu verwendet, die Funktionalität des induziert exprimierten gp130 zu testen. IL-6 ist ein pleiotropes Cytokin [Kishimoto et al., 1992; Akira et al., 1993] und wurde als ein Faktor identifiziert, der für die Induktion der Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten verantwortlich ist. IL-6 gehört zu den proinflammatorischen Cytokinen, welche die Entzündungsreaktion des Organismus regulieren. IL-6 kommt eine Schlüsselstellung in dem Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität zu Mechanismen der erworbenen

Immunität innerhalb des Entzündungsprozesses zu. IL-6 wird durch Immunzellen einschließlich Makrophagen, Gliazellen und sogar Hepatozyten und Neuronen sezerniert [Jüttler et al., 2002]. IL-6 und gp130 können Schmerzen nicht nur indirekt durch ihre proinflammatorische Wirkung sondern auch durch ihre direkte Wirkung auf Nozizeptoren verstärken [Andratsch et al., 2009].

Unter Nozizeption wird die Wahrnehmung von Schmerzen verstanden, also der Erhalt von Signalen im zentralen Nervensystem, die von spezialisierten sensorischen zellulären Rezeptoren (Nozizeptoren) hervorgerufen werden und Informationen über Gewebeschäden vermitteln. Die Nozizeptoren sind primäre afferente Nervenzellen. Sie kommen als freie Nervenendigungen sensibler Neurone der Spinalganglien in allen schmerzempfindlichen Geweben des Körpers vor.

Der IL-6-gp130-Komplex löst *in vitro* und *in vivo* eine Hitzehypersensitivität aus und sensibilisiert den Capsaicin-Rezeptor (*transient receptor potential vanilloid 1 receptor*), einen Ionenkanal sensorischer Nervenzellen. Defekt-Mäuse für gp130 weisen in ihren Nozizeptoren keine gp130-Expression auf und sind dazu geeignet, die Relevanz von IL-6 auf die direkte Schmerzförderung zu beurteilen. Diese Mäuse sind unempfindlich gegenüber einem IL-6-Stimulus und wurden in Modellen für Entzündungs- und Tumor-induzierte Schmerzen untersucht. Sie zeigten eine Reduktion dieser Schmerzen, jedoch keinen Unterschied in der Immunreaktion und dem Tumorwachstum. Diese Ergebnisse zeigten die Bedeutung von gp130 in peripheren nozizeptiven Neuronen und deuten an, dass gp130 für die Therapie von inflammatorischen und Tumor-Schmerzen möglich sein könnte [Andratsch et al., 2009].

In früheren Experimenten [Hüske, 2010; Toptan, 2010b] konnte gezeigt werden, dass sich murine Neuronen aus dorsalen Spinalganglien mit HVS infizieren lassen. Deshalb wurden Virusvektoren hergestellt, die gp130 konstitutiv oder unter der Kontrolle einer Tet-regulierten Kasse exprimieren. Diese Vektoren wurden für die Infektionen von Neuronen der Defekt-Mäuse *in vitro* und *in vivo* verwendet, um den Phänotyp durch die Reexpression von gp130 zu revertieren.

2.5 Viraler Gentransfer

Die Gentherapie beruht auf dem Einbringen von DNA oder RNA in die Zellen eines Organismus zur Bekämpfung oder Prävention einer Krankheit [Abb. 2.10]. Der erste gentherapeutische Ansatz, der es bis in klinische Studien schaffte, begann 1990. Zu diesem Zeitpunkt wurden einer vierjährigen Patientin mit Adenosin-Desaminase-Mangel am National Institutes of Health

in Bethesda Leukozyten entnommen, durch einen Retrovirus-Vektor korrigiert und wieder injiziert. Diese Behandlung führte zu einer längerfristig stabilen Nachweisbarkeit des Transgens [Blaese et al., 1995]. Bei der retroviralen Gentherapie der Defizienz der *common γ chain* wurden längerfristige klinische Erfolge berichtet [Hacein-Bey-Abina et al., 2010].

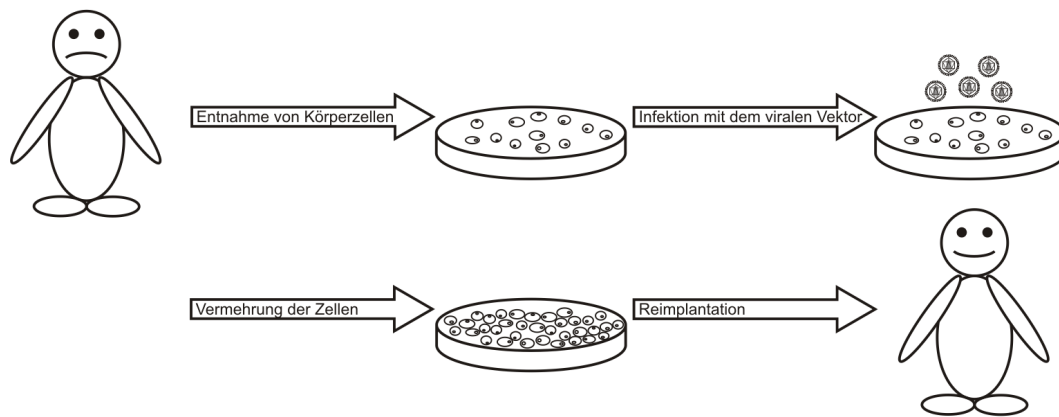


Abb. 2.10: Prinzip der ex vivo Gentherapie über virale Vektoren. Zellen werden aus dem Körper eines Patienten entnommen, im Labor mit einem viralen rekombinanten Vektor transduziert und im Anschluss daran in der Zellkultur vermehrt und beobachtet. Wenn die Zellen die gewünschten Eigenschaften zeigen, können sie in den Patienten reimplantiert werden.

Grundsätzlich werden drei Wege für gentherapeutische Ansätze unterschieden. Sie werden als *ex vivo*, lokal *in vivo* und als systemisch bezeichnet. *Ex vivo* bezeichnet die Methode, bei der Zellen aus dem Patienten entnommen, verändert und wieder zurückgegeben werden. Bei der lokal *in vivo* Methode werden Injektionen in einen abgegrenzten Bereich in den Körper des Patienten vorgenommen (intramuskulär, intratumoral etc.) und bei einer systemischen Gabe wird das Medikament oral oder parenteral gegeben, wodurch es alle Bereiche des Körpers erreichen kann. Der Transfer kann durch virale Vektoren, nicht-virale Vektoren und physikalische Methoden erzielt werden.

Virale Vektoren werden in verschiedenen Bereichen der Forschung verwendet. Sie basieren auf einem replizierendem Virus, das die Möglichkeit besitzt, genetische Information in eine Zelle einzubringen. Ein replizierendes Virus besteht aus codierenden Bereichen, die für die virale Struktur, die regulatorischen Proteine und die Vermehrung des Virus verantwortlich sind, sowie aus den *cis*-regulatorischen Elementen, die für die Verpackung des viralen Genoms und für die Persistenz in der Wirtszelle essentiell sind. Bei viralen Vektoren werden Teile der codierenden Bereiche durch therapeutische Gene ersetzt oder ergänzt.

Tab. 2.4: Vor- und Nachteile von viralen Vektoren. [Robbins et al., 1998; Mountain, 2000; Walther und Stein, 2000; Kootstra und Verma, 2003; Hendrie und Russell, 2005; Bouard et al., 2009]

Vektor	Vorteile	Nachteile
Adenovirus	hohe Transduktionseffizienz <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> ; Transduktion proliferierender und nicht proliferierender Zellen; keine chromosomale Insertion; hohe Virustiter (10^{10} pfu/ml); starke Genexpression; klinische Erfahrungen vorhanden	Größenbeschränkung des Inserts auf 7,5 kb; Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle aufwendig; kurze Dauer der Expression; wiederholte Dosen unwirksam aufgrund starker Immunantwort auf virale Proteine
Adeno-assoziiertes Virus	effiziente Transduktion einer Vielzahl proliferierender und nicht-prolierender Zellen <i>in vivo</i> ; breiter Zelltropismus; sehr lange Expression <i>in vivo</i> ; geringe Immunogenität; vermutlich keine Pathogenität	Größenbeschränkung des Inserts auf 4,5 kb; Herstellung und Qualitätskontrolle aufwendig; hohe Titer selten; wenig klinische Erfahrung; Sicherheitsbedenken aufgrund der Insertionsmutagenese; wiederholte Dosen unwirksam wegen neutralisierender Antikörper; Helfervirus notwendig
Retrovirus	langfristige Expression möglich; hohe Transduktionseffizienz <i>ex vivo</i> ; klinische Erfahrung <i>ex vivo</i> vorhanden; geringe Immunogenität; hohe Virustiter möglich ($10^6 - 10^7$ pfu/ml); breiter Zelltropismus; relativ einfache Manipulation des Genoms	Größenbeschränkung des Inserts auf 8 kb; stabile Insertion ins Genom; Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle aufwendig; geringe Transduktionseffizienz <i>in vivo</i> ; Transduktion nur proliferierender Zellen; Sicherheitsbedenken aufgrund der Insertionsmutagenese; Instabilität der Vektoren, <i>Silencing</i>
Lentivirus	Transduktion proliferierender und nicht proliferierender Zellen; Transduktion hämatopoetische Stammzellen; stabile Genexpression	Größenbeschränkung des Inserts auf 10 kb; Insertion ins Genom; potenzielle Insertionsmutagenese; Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle aufwendig; keine klinische Erfahrung; Sicherheitsbedenken aufgrund möglicher Induktion einer Immunschwäche
Herpesvirus (HSV-1)	breites Wirtsspektrum; Insert bis zu 50 kb; natürlicher Neurotropismus; hohe Virustiter (10^{12} pfu/ml); stabile Viruspartikel; keine Integration ins Wirtsgenom	Veränderungen im Wirtstropismus nur begrenzt möglich; mögliche Toxizität; Gefahr der Rekombination; Latenz; variable Zuverlässigkeit der episodischen Persistenz; Replikationskompetenz
rekombinant		Induktion von Cytotoxizität und Immunreaktionen; cytopathische Effekte
Amplikon	nur <i>cis</i> -Elemente vorhanden; keine viralen Gene; geringe Toxizität; nicht Replikations-kompetent	komplexes Verpackungssystem; geringe Titer
Epstein-Barr-Virus	Transduktion proliferierender und nicht proliferierender Zellen; B-Zell-Tropismus; hohe Insertionskapazität (bis zu 150 kb)	Verpackungszelllinien fehlen
Pockenviren	hohe Insertionskapazität; starke Transgenexpression; geeignet für rekombinante Lebendimpfstoffe	cytopathische Effekte

Der erste Versuch einer Anwendung eines viralen Vektors erfolgte 1976 durch den Molekularbiologen Paul Berg. Dieser transduzierte λ -Bakteriophagen-DNA durch einen SV40-Vektor in Affennierenzellen [Goff und Berg, 1976]. Seit den 1980er Jahren wurde die Arbeit mit viralen Vektoren intensiviert, z.B. wurden retrovirale Vektoren mit Markergenen eingesetzt, damit die Präsenz der markierten Zellen innerhalb des Organismus nachverfolgt werden konnte [Mann et al., 1983]. Unterschiedliche Viren werden für den Gentransfer verwendet: Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Retroviren und Lentiviren, Herpesviren (HSV-1, Epstein-Barr-Virus) und Pockenviren (Vaccinia-Virus). Die verschiedenen viralen Vektoren unterscheiden sich in der Effizienz und Stabilität der Transgenexpression, dem Produktionsaufwand, der Sicherheit, der Toxizität und dem Zielzellspektrum.

HVS wurde von Desrosiers et al. im Jahr 1985 erstmals zu Gentherapie eingesetzt. Neuwelt-Primaten (Braunrückentamarin (*Saguinus fuscicollis*) und Nachtaffen (*Aotus trivirgatus*)) wurden mit HVS-Vektoren infiziert, welche das Gen für das bovine Wachstumshormon (*bovine growth hormone*, BGH) trugen [Desrosiers et al., 1985]. In weiteren Versuchen mit auf HVS basierenden Vektoren wurden die Vorteile des Systems sichtbar [Desrosiers et al., 1984; Grassmann und Fleckenstein, 1989]. Zu den wichtigen Vorteilen zählt die hohe Klonierungskapazität. Die bisher größte inserierte Fremdsequenz umfasste ca. 10.000 bp [Toptan et al., 2010a]. Außerdem infiziert HVS eine Vielzahl von Zelltypen und persistiert dort langfristig als Episom ohne chromosomale Integration [Fickenscher und Fleckenstein, 2001; Whitehouse, 2003; Ensser und Fleckenstein, 2005].

2.6 MicroRNAs bei Herpesvirus saimiri

Mit der Genexpression interferierende microRNAs (miRNA, miR) wurden bereits 1993 beschrieben [Lee et al., 1993]; die Namensgebung erfolgte jedoch erst 2001 [Ruvkun, 2001; Lee et al., 2004]. miRNAs sind hoch konservierte, nichtcodierende RNAs von 21 bis 23 Nukleotiden und regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene, indem sie die Degradation der Ziel-mRNA, die mRNA-Deacetylierung und die Translationsrepression induzieren [He und Hannon, 2004]. Bioinformatische Vorhersagen und experimentelle Untersuchungen legen nahe, dass 20 bis 30 % der menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden [Lewis et al., 2005; Xie et al., 2005; Yeom et al., 2006]. Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass Art und Anzahl der miRNA-Moleküle oft mit dem aktuellen Zustand der Zelle korrelieren. miRNAs wirken zusammen mit Transkriptionsfaktoren und beeinflussen dadurch die Neurogenese, Myogenese,

Kardiogenese und Hämatopoese [Chen et al., 2004; Zhao et al., 2005; Rao et al., 2006; Makeyev et al., 2007].

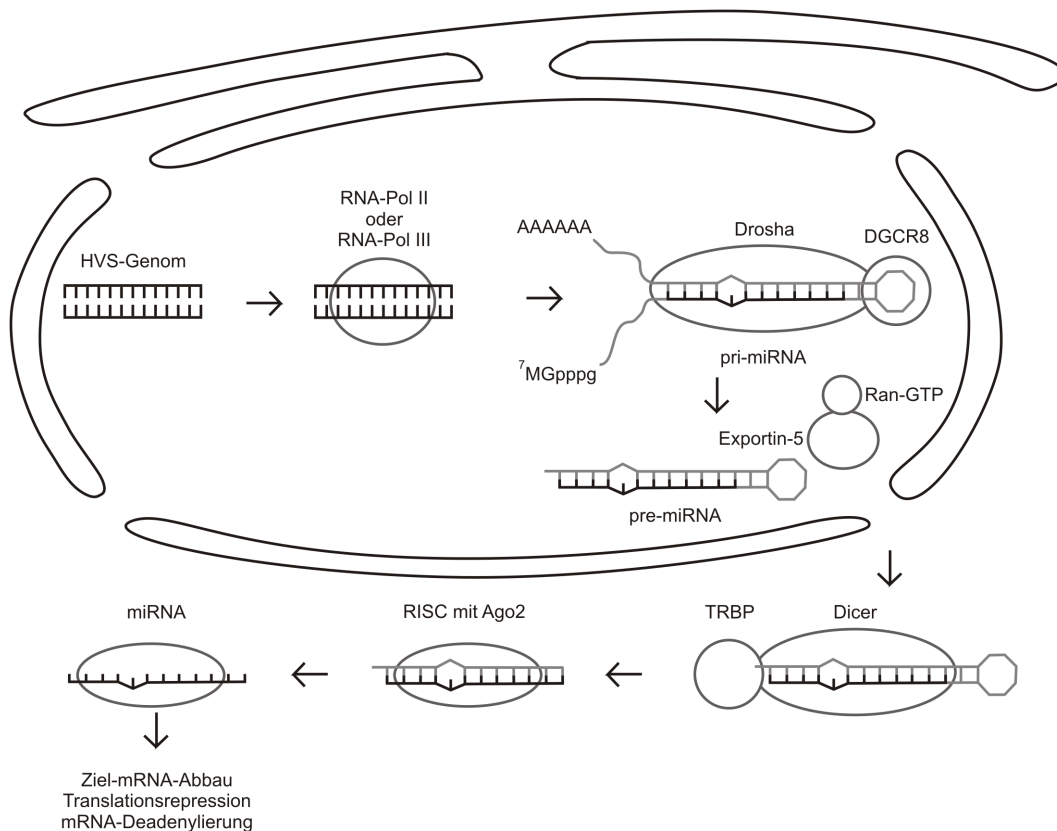


Abb. 2.11: Prozessierung von miRNAs. Nach der Transkription durch die RNA-Polymerase II oder III wird die pri-miRNA durch Drosha und DGCR8 erkannt und zur pre-miRNA prozessiert. Diese wird mit Hilfe von Exportin-5 durch den Kernporenkomplex ins Cytoplasma geschleust. Im Cytoplasma prozessiert ein Komplex aus Dicer und TRBP die pre-miRNA zur ds-miRNA, die im RNA-induced *silencing complex* (RISC) als einzelsträngige miRNA ihre Ziel-RNA bindet.

Die Prozessierung der miRNA findet im Zellkern und im Cytoplasma statt [Abb. 2.11]. Das Primärtranskript der miRNA, die pri-miRNA, wird von der RNA-Polymerase II oder III transkribiert und besteht aus 500 bis 3000 Nukleotiden mit einem 7-Methylguanosphäp und einem polyA-Schwanz. Wenn die pri-miRNA eine Haarnadelschleife gebildet hat, wird sie durch die RNase III Drosha und das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein DGCR8 erkannt. Dieser Komplex prozessiert die pri-miRNA zur Vorläufer-miRNA (pre-miRNA), die nur noch 70 bis 80 Nukleotide umfasst. Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 und Ran-GTP durch den Kernporenkomplex ins Cytoplasma exportiert. Dort wird es durch die RNase III Dicer und das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein TRBP erkannt und in Doppelstrang-miRNAs von 17 bis 24 Nukleotiden geschnitten. Der Einzelstrang mit dem 5'-Ende der pri-miRNA bildet dabei die

reife miRNA, die in einem Ribonukleoproteinkomplex, dem RNA-induzierten *silencing complex* (RISC), die Ziel-RNA bindet oder dann abbaut [Wienholds und Plasterk, 2005; Kim und Nam, 2006].

Virale miRNAs sind besonders bei DNA-Viren bekannt. Die meisten dieser miRNAs werden dabei über den bekannten Prozessierungsweg der zellulären miRNAs gebildet und bilden ähnliche Effektorkomplexe [Grundhoff und Sullivan, 2011]. Bisher wurden 146 virale miRNA-Haarnadelstrukturen gefunden, von denen 139 aus Herpesviren stammen. Eine computer-gestützte Analyse der vollständig sequenzierten γ -Herpesvirus-Genome des Epstein-Barr-Virus und des Rhesusaffen-Lymphocryptovirus ergab 17 neuartige pre-miRNAs [Walz et al., 2010].

HVS besitzt am linken Ende seiner L-DNA ein Cluster sieben kleiner nicht-codierender regulatorischer RNAs der Sm-Klasse (HSUR1 bis 7), die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden und in latent infizierten Krallenaffen-T-Lymphozyten dominieren [Murthy et al., 1986; Lee et al., 1988; Wassarman et al., 1989; Lee und Steitz, 1990; Albrecht und Fleckenstein, 1992]. Die HSURs 1, 2 und 5 umfassen 114 bis 143 Nukleotide und die HSURs 3, 4, 6 und 7 haben 75 bis 106 Nukleotide [Albrecht et al., 1992; Ensser et al., 2003; Conrad et al., 2006]. Im Cytoplasma bilden die HSURs über ihre Sm-Proteinbindestellen miRNP-Sm-Komplexe und wandern in den Zellkern, wo sie mit zellulären nicht-codierenden snRNAs kolokalisieren [Golembe et al., 2005]. Nur die HSURs 1 und 2 sind innerhalb der Untergruppen A, B und C von HVS konserviert [Conrad et al., 2006]. Sie induzieren die Transkription einiger Wirtsgene [Cook et al., 2005]. Parallel zu unserer Arbeit wurden sechs miRNA-Kandidaten bei der HVS-Untergruppe A11 in latent infizierten Krallenaffen-T-Lymphozyten identifiziert [Cazalla et al., 2011]. Diese miRNA-Kandidaten stammen von drei Haarnadelstrukturen ab, die stromabwärts von Signalen für die 3'-Prozessierung dreier HSUR-Gene liegen. Diese miRNAs binden Ago-Proteinen, sind biologisch aktiv und werden Drosha-unabhängig, aber abhängig von Dicer prozessiert. Wir untersuchten vor allem HSUR2 des HVS-Stamms C488 im lytischen und latenten Zustand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Grundhoff am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg.

2.7 Genomsequenzierung von Herpesvirus saimiri

Pyrosequenzierung ist ein Verfahren der DNA-Sequenzierung zum Nachweis von Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen sowie zur Genomsequenzierung [Ronaghi, 2001; Nyrén, 2007]. Die DNA-Sequenz wird bei dieser Methode direkt durch Lichtemission beim Einbau eines

Nukleotids bestimmt. Die Nukleotide werden einzeln und in wiederkehrender Abfolge zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Beim Einbau des passenden Nukleotids wird Pyrophosphat freigesetzt, das durch die Adenosintriphosphat-(ATP)-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wird. Das ATP treibt die Luciferase-Reaktion an, wodurch Luciferin in Oxyluciferin umgesetzt wird. Dies resultiert in einem Lichtsignal, das von einer CCD-Kamera detektiert wird. Die Signalstärke ist proportional zur Menge des umgesetzten ATP und somit zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Die überschüssigen Nukleotide werden abgebaut, wodurch die Reaktion mit dem nächsten Nukleotid fortgesetzt werden kann. Das Verfahren eignet sich besonders für kurze DNA-Sequenzen und für die Miniaturisierung und für die Anwendung in parallelen Massenansätzen. Dadurch entsteht eine große Menge an Sequenzdaten, die Computer-gestützt übereinander gelagert und ausgewertet werden und somit eine genaue und langstreckige Sequenzierung ermöglichen. In diesem Projekt wurde die Sequenz des BACs von HVS C488 sequenziert und mit der bekannten Sequenz aus Subklonen des viralen Genoms abgeglichen [Ensser et al., 2003].

2.8 Zielsetzungen der Arbeit

Redirektion der Antigen-Spezifität

In diesem Teil der Arbeit sollten zwei virale Vektorkonstrukte, die einen chimären T-Zell-Rezeptor gegen den Tumormarker ErbB2 exprimieren, miteinander verglichen werden. Das Ziel war eine langfristige funktionelle Expression des cTCRs auf der Oberfläche transduzierter humaner T-Lymphozyten. Die Funktionalität sollte durch die spezifische Lyse humaner Tumorzellen durch den Kontakt mit den transduzierten T-Lymphozyten und durch geeignete Kontrollen untersucht werden. Diese Experimente sollten auf weitere Zelllinien und primäre Tumor-Zellkulturen erweitert werden, die auch auf ihre ErbB2-Expression untersucht werden sollten. Durch weitere Cytotoxizitäts-Testverfahren sollten die Ergebnisse bestätigt und erweitert werden, wie z.B. zur Granulafreisetzung und der Blockade der spezifischen Lyse. Außerdem sollte die Funktionalität von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten verglichen werden.

Tumorspezifische Transgenexpression durch regulatorische Elemente des Alpha-Fetoprotein-Gens

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte durch den Einsatz der genregulatorischen Kasette des AFP-Gens die Expression eines Transgens spezifisch in AFP-positiven Zellen erreicht werden. Dazu sollte das Tetracyclin-Doppelschalter-System Zelltyp-spezifisch exprimiert werden. Dabei sollte die Dauer und Stärke der Transgenexpression in den Hepatomzellen und die

Effizienz der Tet-abhängigen und AFP-abhängigen Regulation untersucht werden. Zunächst sollte das grün fluoreszierende Protein als Transgen verwendet werden. Verschiedene Konstrukte mit und ohne regulatorischer AFP-Kassette sollten in AFP-positiven und AFP-negativen Zelllinien verglichen werden. Sodann sollte der Zelltyp-spezifische Tet-Schalter zur Expression der apoptotischen Proteine tBid und reverse Caspase 3 verwendet und die gezielte Apoptose induziert und quantifiziert werden.

T-Zell-spezifische Expression durch den CD2-Enhancer-Promotor

Für den Einsatz des Tetracyclin-Schalters spezifisch in T-Zellen sollten rhadinovirale Vektoren konstruiert und untersucht werden. Hier sollte der Enhancer und der Promotor des CD2-Gens für die Expression der Transaktivatoren und Transsilencer des Tet-Schalters eingesetzt werden. Über homologe Rekombination sollten bestehende Vektoren gezielt verändert und die resultierenden Virusvektoren zur Transduktion humaner T-Lymphozyten verwendet werden. Als Testtransgen sollte das grün fluoreszierende Protein dienen. Im Anschluss sollte die Apoptose-Induktion durch proapoptotische Gene in humanen T-Lymphozyten untersucht werden.

Glykoprotein 130

Der vierte Abschnitt sollte der Herstellung rhadinoviraler Vektoren zur Untersuchung von gp130 in der nozizeptiven Neurophysiologie dienen. Diese rhadinoviralen Vektoren sollten ein bicistronisches Konstrukt aus murinem Glykoprotein gp130 und dem Fluoreszenzprotein ds-Red konstitutiv oder induzierbar exprimieren. Die Transgenexpression dieser Vektoren sollte detailliert untersucht werden und in geeigneten Hamsterzellen eingesetzt werden, damit die IL-6-Antwort nach Transduktion demonstriert werden konnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Reagenzien

3.1.1 Plasmide, BACs und Bakterien

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCR2.1	TOPO-TA-Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor	Fermentas, St. Leon-Roth
pep-Kan-S2	Transfervektor für Kana-Marker und SceI-Schnittstelle mit Amp-Resistenz	Tischer et al., 2006
pL[scFv(FRP5)/ hinge/ζ]SN	variables Einzelkettenfragment des monoklonalen Antikörpers FRP5	Moritz et al., 1994
pIRES-dsRed	Expressionsplasmid für dsRed mit vor- geschalteter IRES-Sequenz	Clontech, Mountain View, USA
pSVL-gp130	Expressionsplasmid für murines gp130	Michaela Kress, Physiologie, Innsbruck
pcDNA3.1(-)n-H Sprr1A	Expressionsplasmid für murines Sprr1A	Michaela Kress, Physiologie, Innsbruck

BAC	Beschreibung	Quelle
WTf ^{C488-BAC}	HVS-Genom als BAC mit mini-F- Fragment in <i>ORF14</i> zur Tet-regulierten Expression von:	Toptan et al., 2010a
hCGF ^{C488-BAC}	- eGFP in <i>ORF75</i>	Toptan, 2010b
hCBF ^{C488-BAC}	- tBid in <i>ORF75</i>	Toptan, 2010b
hCCF ^{C488-BAC}	- reverser Caspase 3 in <i>ORF75</i>	Toptan, 2010b
HGF ^{C488-BAC} / HGR ^{C488-BAC}	- eGFP oberhalb von <i>StpC</i>	Hüske, 2010
HCF ^{C488-BAC} / HCR ^{C488-BAC}	- reverser Caspase 3 oberhalb von <i>StpC</i>	Hüske, 2010
HBf ^{C488-BAC} / HBR ^{C488-BAC}	- tBid oberhalb von <i>StpC</i>	Hüske, 2010

Bakterium	Beschreibung
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> (F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>arg</i> F) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ <i>gyrA96 relA1</i>), chemisch kompetent (Invitrogen)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>E. coli</i> (<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>pro-AB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]), chemisch kompetent (Stratagene, Amsterdam)
<i>E. coli</i> GS1783	<i>E. coli</i> mit induzierbarem I-SceI-Gen und integrierten, defekten λ -Prophagen mit Expressionskassette für <i>exo</i> , <i>gam</i> , <i>beta</i> , rekombinationskompetent [Tischer et al., 2006]

3.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
allgemein		
OMK	HVS-permissive Nachtaffen-Nierenzellen (ATCC CRL-1556)	Daniel et al., 1976
T-Lymphozyten	isoliert aus Blutspenden (<i>buffy coats</i>)	
Projekt chimärer T-Zell-Rezeptor		
BT20M	von einer 74-jährigen Patientin mit einem Mammakarzinom (ATCC HTB-19)	
KL	sieben verschiedene Subpopulationen von Ovarialkarzinomen aus Aszites	Frauenklinik Kiel
MCF7	von einer 69-jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Mamma (ATCC HTB-22)	Soule et al., 1973
MDA-MB231	von einer 51-jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Mamma (ATCC HTB-26)	Cailleau et al., 1978
MDA-MB453	von einer 48-jährigen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom; mit Überexpression des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptors (ATCC HTB-131)	Cailleau et al., 1978
MDA-MB468	von einer 51-jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Mamma (ATCC HTB-132)	Cailleau et al., 1978
NIH3T3	murine Fibroblastenzelllinie (ATCC CRL-1658)	Todaro et al., 1963
NIH3T3-ErbB2	murine Fibroblastenzelllinie mit stabil transfiziertem ErbB2	Bargmann et al., 1986
Renca	murine Nierenkarzinomzelllinie (ATCC CRL-2947)	Murphy und Hrushesky, 1973

Fortsetzung 1: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Projekt chimärer T-Zell-Rezeptor		
SKBR3	von einer 43-jährigen Patientin mit Mammakarzinom, aus dem Pleuraerguss isoliert (ATCC HTB-30)	Trempe, 1976
SKOV3	von einer 64-jährigen Patientin mit ovariellen Adenokarzinom (ATCC HTB-77)	Fogh et al., 1975
T47D	von einer 54-jährigen Patientin mit einem infiltrierenden duktalen Mammakarzinom (ATCC HTB-133)	Keydar et al., 1979
ZG	19 primäre Mammakarzinom-Zellkulturen	Frauenklinik Kiel
Projekt Alpha-Fetoprotein		
AKN1	Hepatozyten von einem gesunden 10-jährigen Patienten	Nussler et al., 1998
Huh7	von einem 57-jährigen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom	Nakabayashi et al., 1982
Huh7.5	von der humanen Hepatomzelllinie Huh7 abgeleitet	Blight et al., 2002
HepG2	von einem 15-jährigen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (ATCC HB-8065)	Knowles et al., 1980
Hep3B	von einem 8-jährigen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom mit integriertem Hepatitis-B-Virus-Genom (ATCC HB-8064)	Aden et al., 1979
HuccT1	von einem 56-jährigen Patienten mit cholangiozellulärem Adenokarzinom aus Aszites	Miyagiwa et al., 1989
SK-Hep1	von einem 52-jährigen Patienten mit einem Adenokarzinom der Leber aus Aszites (ATCC HTB-52)	Fogh et al., 1975
Projekt CD2		
Jurkat	immortalisierte humane T-Zelllinie, Klon E6.1, etabliert aus peripheren Lymphozyten eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie, Suspensionskultur (ATCC TIB-152)	Schneider et al., 1977

Fortsetzung 2: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Projekt gp130		
CHO-K1	Subklon von der parentalen Zelllinie CHO von einer Ovarbiopsie eines Chinahamsters (<i>Cricetulus griseus</i>) (ATCC CCL-61)	Puck et al., 1958
BAF3	immortalisierte murine Pro-B-Zelllinie aus dem Knochenmark	
Projekt miRNA		
CB15	T-Lymphozyten aus humanem Nabelschnurblut mit HVS C488 transformiert	Biesinger et al., 1992
B222	T-Lymphozyten aus <i>Saguinus oedipus</i>	

3.1.3 Rekombinante Mutanten von Herpesvirus saimiri

Virus	Beschreibung
allgemein	
WT ^{HVS}	Wildtypvirus (WT) HVS C488
WT ^{rHVS}	rekombinanter WT mit mini-F-Fragment von pBeloBAC11 in <i>ORF14</i>
WT Δ 1 ^{rHVS}	WT ^{rHVS} mit einer Deletion von <i>ORF1</i> (<i>stpC</i> und <i>tip</i>)
Projekt chimärer T-Zell-Rezeptor	
scfr-IRES ^{rHVS}	cTCR-Leserahmen zwischen dem <i>ORF1</i> -Promotor und dem <i>stpC</i> als tricistronische Transkriptionseinheit, von IRES gefolgt
scfrULT ^{rHVS}	separat transkribierter cTCR mit HTLV-EF1 α -Promotor und polyA-Signal
Projekt: Alpha-Fetoprotein	
Tet-regulatorische Kasette in <i>ORF75</i> mit verschiedenen Promotoren und Transgenen	
A: regulatorische Kasette (rK) von AFP; B: tBid; C: reverse Caspase 3; F: direkte Orientierung; G: eGFP; hC: Promotor des humanen Cytomegalovirus; M: Promotor des Maus-Mammatumovirus; R: reverse Orientierung; Δ 1: Deletion von <i>ORF1</i>	
hCGF Δ 1 ^{rHVS}	Tet-Promotor: PGK-Promotor; Transgenpromotor: hCMV-Promotor; Transgen eGFP; direkte Orientierung
AhCGF Δ 1 ^{rHVS}	Tet-Promotor: rK-AFP; Transgenpromotor: hCMV-Promotor; Transgen: eGFP; direkte Orientierung
AhCGR Δ 1 ^{rHVS}	AhCGF Δ 1 ^{rHVS} ; reverse Orientierung
AMGF Δ 1 ^{rHVS}	Tet-Promotor: rK-AFP; Transgenpromotor: MMTV-Promotor; Transgen: eGFP; direkte Orientierung
AMGR Δ 1 ^{rHVS}	AMGF Δ 1 ^{rHVS} ; reverse Orientierung

Fortsetzung 1: rekombinante Mutanten von Herpesvirus saimiri

Virus	Beschreibung
Projekt Alpha-Fetoprotein	
AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: rK-AFP; Transgenpromotor: hCMV-Promotor; Transgen: tBid; direkte Orientierung
AhCBR $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
AhCCF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: rK-AFP; Transgenpromotor: hCMV-Promotor; Transgen: reverse Caspase 3; direkte Orientierung
AhCCR $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	AhCCF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
Projekt: Projekt: CD2	
Tet-regulatorische Kasette vor <i>stpC</i> mit verschiedenen Tet-Promotoren und Transgenen	
B: tBid; 1. C: CD2-Promotor; 2. C: reverse Caspase 3; E: CD2- Enhancer; F: direkte Orientierung; G: eGFP; H: HTLV-EF1 α -Promotor; R: reverse Orientierung	
HGF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: HTLV-Promotor; Transgen: eGFP; direkte Orientierung
HGR $^{\text{rHVS}}$	HGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
CGF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Promotor; Transgen: eGFP; direkte Orientierung
CGR $^{\text{rHVS}}$	CGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
ECGF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Enhancer und -Promotor; Transgen: eGFP; direkte Orientierung
ECGR $^{\text{rHVS}}$	ECGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
HBF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: HTLV-Promotor; Transgen: tBid; direkte Orientierung
HBR $^{\text{rHVS}}$	HGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
CBF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Promotor; Transgen: tBid; direkte Orientierung
CBR $^{\text{rHVS}}$	CGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
ECBF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Enhancer und -Promotor; Transgen: tBid; direkte Orientierung
ECBR $^{\text{rHVS}}$	ECGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
HCF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: HTLV-Promotor; Transgen: reverse Caspase 3; direkte Orientierung
HCR $^{\text{rHVS}}$	HGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
CCF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Promotor; Transgen: reverse Caspase 3; direkte Orientierung
CCR $^{\text{rHVS}}$	CGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung
ECCF $^{\text{rHVS}}$	Tet-Promotor: CD2-Enhancer und -Promotor; Transgen: reverse Caspase 3; direkte Orientierung
ECCR $^{\text{rHVS}}$	ECGF $^{\text{rHVS}}$; reverse Orientierung

Fortsetzung 2: rekombinante Mutanten von Herpesvirus saimiri

Virus	Beschreibung
Projekt gp130	
Transgenkassette mit gp130-IRES-dsRed in <i>ORF75</i> mit verschiedenen Transgen-promotoren	
1. C: C-Terminus <i>ORF75</i> ; 2. C: Promotor des humanen Cytomegalovirus; F: direkte Orientierung; G: gp130; H: HTLV-EF1 α -Promotor; N: N-Terminus <i>ORF75</i> ; P: polyA-Signal; R: reverse Orientierung; T: Tet-Operatoren	
NP-CGF ^{rHVS}	Transgenpromotor: hCMV-Promotor; konstitutive Expression; direkte Orientierung
CP-CGR ^{rHVS}	NP-CGF ^{rHVS} ; reverse Orientierung
TP-CGF ^{rHVS}	Transgenpromotor: hCMV-Promotor; tet-abhängige Expression; direkte Orientierung
TP-CGR ^{rHVS}	TP-CGF ^{rHVS} ; reverse Orientierung
TP-HGF ^{rHVS}	Transgenpromotor: HTLV-Promotor; tet-abhängige Expression; direkte Orientierung
TP-HGR ^{rHVS}	TP-HGF ^{rHVS} ; reverse Orientierung

3.1.4 Oligonukleotide

Nr.	Verwendung	Sequenz in 5' → 3'-Orientierung
Klonierungen		
P1	HVS-Genom	G T T A G A A A T A A T G C T T G C T G C A T T G C
P2	HVS-Genom	G T G A G A G C A G T G A C A T G C T A G G T A
P3	HVS-Genom	T G C T C A A C A T T G C T T C T G T C
P4	HVS-Genom	A T G C T T T T A G T A G T T T G A G G
P5	HVS-Genom	C A G C G C A T G G C T G C A T G G T G T A A
P6	HVS-Genom	A G C G C C T A G C C A A T G C T A T G A A G
P7	HVS-Genom	T G C A A G C A C A G A A C T T C A G T T G A C T C
P8	HVS-Genom	C C T A G G G G C G C G C C G T T G C A A A T A A A G T T T A C T T T T A A C
P9	HVS-Genom	G G C G C G C C A T G G C T G C T A A C A G G C A T G G
P10	HVS-Genom	G G G G C G C G C C A G A G G T A G T C A G T C T T T G G
P11	HVS-Genom	G G C C T A G G G C G G C C G C A T G G C T G C T A A C A G G C A T G G
P12	HVS-Genom	G G C C T A G G G C G G C C G C T C A T T C T T T T A C A C A C C A C A G G
P13	HVS-Genom	G G C C T A G G G G C G C G C C C T T T A T G G C T C A A C T T T C A T G T T C C
P14	Deletion ORF1	G C A T T T C T T T T A A T C A C C A T G C A C A C A C A T T T G T T A A C A G T T T T G T T A C A T T T T T T C A A G A C T G T T T G T G T T G C T T A G G G A T A A C A G G G T A A T C G A T T T
P15	Deletion ORF1	A G T A A C A C A A G A A A C A G C T A A C A A G A G C A A C A C A A A C A G T C T T G A A A A A A T G T A A C A A A A C T G T T A A C A A A T G T G G C C A G T G T T A C A A C A A T T A A C C
P16	pCR2.1	C T G C A A G G C G A T T A A G T T G G
P17	CD2 P	C A C A C A C T T G T G C A T T T G C G T G T T T A C T A C A T A G T G T G G A T T A C T T A T A G A A G G C G C G C C C C T A G G G A T G A G A A A A C C T A T C C T T C
P18	CD2 P	A T T G A G T A A T T C C A G A G C G C C G T T T A T G A C T T T G C T C T T G T C C A G T C T A G A C A T A T C G A T C T T A G G G G T T G G T T T C C T C T
P19	CD2 P	A T A A A G T A A C C A G C A C C A C T T A A A G T A G T T A A A A G T A A A C T T T A T T T G C A A C G G C G C G C C C C T A G G G A T G A G A A A A C C T A T C C T T C
P20	CD2 P	G C C A A A G C A G A T G T G T T T A T

Fortsetzung 1: Oligonukleotide

Nr.	Verwendung	Sequenz in 5' → 3'-Orientierung
Klonierungen		
P21	Kana ^R CD2 P	CCTAGGGATGAGAAAACCTATCCTTCCCAATTTTTTTTG TGTGAGAATTAAAAATGCAGCAAGAAAACCTAGGGATAAC AGGGTAATCG
P22	Kana ^R CD2 P	CCTAGGAGTGTTACAACCAATTAACC
P23	CD2 Enh	CGCCGGCGGTACAAAACGAAAGCACAGAG
P24	CD2 Enh	CCTAGGGGCGCGCCGTTGCAAATAAAGTTTACTTTTAA C
P25	CD2 Enh	CCTAGGGTTCGACGATGAGAAAACCTATCCTTCCC
P26	CD2 Enh	CCTAGGCGCGCGCGCTTAGGGGTTGGTTTTCCTC
P27	CD2 Enh	GTCGACGGCGCGCCGAATCAAATCTTAAGTGTC
P28	CD2 Enh	GTCGACCCCTGACCTCAGGTGATCTACC
P29	CD2 Enh	GGGGATATCGAATCAAATCTTAAGTGTCTTAAATG
P30	CD2 Enh	GGGGATATCCCTGACCTCAGGTGATCTACC
P31	CD2 Enh	CGCCGGCGGTACAAAACGAAAGCACAGAG
P32	Kana ^R CD2 Enh	GGCGCGCCGAATCAAATCTTAAGTGTCTTAAATGACTA TGATTAAAAAGGTCAGACCCCTAGGGATAACAGGGTAAT GCCAGTGTTACAACCAATTAACC
P33	Kana ^R CD2 Enh	GGCGCGCCACAGGGTAATCGATTTATTCAACAAAGCC
P34	hCMV P	GGAGCGCTGCGGCCGCCCTATATAAGCAGAGCTCG
P35	hCMV P	GGAGCGCTAGGCTGGATCGGTCCC GG TG
P36	HTLV-EF1α P	TGAAGGAGAGATGCGAG
P37	HTLV-EF1α P	TGCTTGCTCAACTCTAC
P38	HTLV-EF1α P	GGAGCGCTGCGGCCGCCGCTCCGGTGCCCGTCA GTGG
P39	HTLV-EF1α P	GGAGCGCTTAGGCGCCGGTCAAGCTTGG
P40	polyA	CTCCCCCTGAACCTGAAAC
P41	polyA	TTTATGTTTTCAGGTTTCAGGG
P42	polyA	GGCCTAGGGGCGCGCCTTGGTTCGAGCTGATACTTCC
P43	polyA	GGCCTAGGGCGCGCCGCGCTAGCAGGCCGCGACTCTAG
P44	Tet-Kassette	GCCGGTTCGAACAGCTCAATT
P45	Tet-Kassette	GAACCCCTTCAGAGCACAGCGGAATGACTTGG
P46	Tet-Kassette	GGCCTAGGGCGGCCGCGGTACCTTCTCTATCACTGATA GGG
P47	Tet-Kassette	GGGGCGCGCCGTGAGCTCTTAATTAAACG
P48	Tet-Kassette	GGCCTAGGGCGGCCGCGGTACCTTCTCTATC
P49	Tet-Kassette	AAACGAGCTCTGCTTATATAGGGCCTAGGGCGGCCGCG GTACC
P50	miniF	ATCGGTCTGGGACCACGGTCCCAC
P51	AFP rK	ACAATGTCTTGTGTGCCTGG
P52	AFP rK	TTTTGTTTTAAATGTGTGCC
P53	gp130	TGCAGACACGCCCTCCTTCAGC
P54	gp130	TTGTTCAGACTGAAGCAGCAGC
P55	Kana ^R gp130	GGCCCCGGGTTCGATTTATTCAACAAAGCC
P56	Kana ^R gp130	GGCCCCGGGTCACTGCGGCATGTAGCCACCTTGTCTTAC AGTCTGTGGCAAGTAACCTTTCAGTGTTACAACCAATTA ACC
P57	Kana ^R gp130	GAACCGTTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT TTGACCTCCATAGAAGACCCGGGACCGATCCAGCCTT CGATTTATTCAACAAAGCC
P58	Kana ^R gp130	GTGAGGAAAAAAGCAAAGCTTGCGCTAGCCAAATCCT TGGTGCTGACATGGTCCC GG TG TCTTCTATGGAGGTCA AAACCAGTGTTACAACCAATTAACC
P59	Kana ^R gp130	GGGATATCTCGATTTATTCAACAAAGCC
P60	dsRed	CCACCACCTGTTCTCTGTAG
P61	Sprr1A	CTCGAGATGAGTTCCCAACAGCAGAAGC
P62	Sprr1A	CTCGAGTTACTTCTGCTTTGTCTTCTGCT
P63	Kana ^R Sprr1A	GATATCTTACTTCTGCTTTGTCTTCTGCTGGTATGGTG ATGGAGTGACAGTTGAGGTAGGGATAACAGGGTAATGC CAGTGTTACAACCAATTAACC

Fortsetzung 2: Oligonukleotide

Nr.	Verwendung	Sequenz in 5' → 3'-Orientierung
RT-PCR		
P64	scfr	TGGCTGCTAACAGGCATGG
P65	scfr	AGCACGTTGCCCGAGATTG
P66	<i>ORF75</i>	GATGATGACTCCGTAGATG
P67	<i>ORF75</i>	ACGGCTACGTTCTTACTG
P68	gp130	TCACTGTCAATCAACAGAAAC
P69	gp130	ACACATATTCTGTAAAAGGC
P70	sprriA	AAGCAGCCCTGCACTGTACC
P71	sprriA	AGTTGAGGGGCGAGGGCTCGGG
P72	AFP	ATTCAGACTGCTGCAGCCAA
P73	AFP	GTGCTCATGTACATGGGCCA
P74	GAPDH, human	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG
P75	GAPDH, human	TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG
P76	GAPDH, Hamster	CAAGGCTGAGAATGGAAAGC
P77	GAPDH, Hamster	CCTTCCACAATGCCAAAGTT
Sequenzierungen		
P78	HVS-Genom	GCTGCTTTTAAACCTCACACACAAGG
P79	HVS-Genom	GAGGGGTGAGAGCAGTGACATGC
P80	HVS-Genom	GAGTTTCCAAAATGTACTAAGCTAAC
P81	HVS-Genom	TCAGACAAGAAAGTGGGCAATG
P82	pCR2.1	TAAATACGACTCACTATAGGG
P83	pCR2.1	GTAAAACGACGGCCAGTG
P84	pCR2.1	CACAGGAAACAGCTATGACC
P85	pCR2.1	ACACTTTATGCTTCCGGCTC
P86	hCMV P	AGAGCTCGTTTAGTGAAACCG
P87	IRES	TATAGACAAACGCACACCG
P88	polyA	GTGGTTTGTCCAAACTCATC
P89	Kana ^R	GCAAAGGTAGCGTTGCCAATG
P90	Kana ^R	CGAGGCAGTTCCATAGGATGG
P91	Kana ^R	TTCTCCTTCATTACAGAAACGGC
P92	Kana ^R	TTATCGCGAGCCCATTTATACC
P93	CD2 Enh	CCTGCCAGAGTGTAACAAGGTT
P94	CD2 Enh	GCTCACTGAGGATTGAACTACTT
P95	gp130	CCTTCCCAAGGGCATTCTCTGC
P96	gp130	AGTGGGCAACAGAGAAGTTTCC
P97	gp130	CAGGAATATAGATCTGTACG
P98	gp130	TGAAGGCGTACCTCAAACAAGC
P99	gp130	CAAAAGATCAAAATGTACTCGG
P100	gp130	TTGTCAGACTGAAGCAGCAGC
P101	gp130	CAAAAATGTCTGTAACAACCTCCGCC
P102	SprriA	AGGGCTCTGGCACCTTGGGG
Taqman-Assay		
(VIC [®] : gelb fluoreszierender Farbstoff; FAM/Fluorescein amidite: grün fluoreszierender Farbstoff)		
P103	cDNA 5p	GTGCTATCCAGTGCGAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGA TACGACAGTTTA
P104	5p	CGATGTGCTCTCAGTACTG
P105	Taqman 5p	VIC-TGGATACGACAGTTTACA-MGBNFQ
P106	cDNA 3p	GTGCTATCCAGTGCGAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGA TACGACGCTCTC
P107	3p	CGATATATAGTGTTGAG
P108	Taqman 3p	VIC-TGGATACGACGCTCTCAA-MGBNFQ
P109	3p/5p	GTGCAGGGTCCGAGGT
P110	GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
P111	GAPDH	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
P112	Taqman GAPDH	FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCCT-BBQ

3.1.5 Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Erkennungssequenz (↓, ↑: Schnittstellen)
Alw44I	5' . . . G↓TGCAC . . . 3' 3' . . . CACGT↑G . . . 5'
BamHI	5' . . . G↓GATCC . . . 3' 3' . . . CCTAG↑G . . . 5'
BcuI	5' . . . A↓CTAGT . . . 3' 3' . . . TGATC↑A . . . 5'
BglII	5' . . . A↓GATCT . . . 3' 3' . . . TCTAG↑A . . . 5'
Bsp1407I	5' . . . T↓GTACA . . . 3' 3' . . . ACATG↑T . . . 5'
Bsu15I	5' . . . AT↓CGAT . . . 3' 3' . . . TAGC↑TA . . . 5'
Eco32I	5' . . . GAT↓ATC . . . 3' 3' . . . CTA↑TAG . . . 5'
Eco47III	5' . . . AGC↓GCT . . . 3' 3' . . . TCG↑CGA . . . 5'
Eco72I	5' . . . CAC↓GTG . . . 3' 3' . . . GTG↑CAC . . . 5'
Eco91II	5' . . . G↓GTNACC . . . 3' 3' . . . CCANTG↑G . . . 5'
HindIII	5' . . . A↓AGCTT . . . 3' 3' . . . TTCGA↑A . . . 5'
I-CeuI	5' . . . TAACTATAACGGTCTAA↓GGTAGCGA . . . 3' 3' . . . ATTGATATTGCCAG↑GATTCCATCGCT . . . 5'
I-SceI	5' . . . TAGGGATAA↓CAGGGTAAT . . . 3' 3' . . . ATCCC↑TATTGTCCCATTA . . . 5'
MreI	5' . . . CG↓CCGGCG . . . 3' 3' . . . GCGGCC↑GC . . . 5'
Mph1103I	5' . . . ATGCA↓T . . . 3' 3' . . . T↑ACGTA . . . 5'
NcoI	5' . . . C↓CATGG . . . 3' 3' . . . GGTAC↑C . . . 5'
NheI	5' . . . G↓CTAGC . . . 3' 3' . . . CGATC↑G . . . 5'
NotI	5' . . . GC↓GGCCGC . . . 3' 3' . . . CGCCGG↑CG . . . 5'
PaeI	5' . . . GCATG↓C . . . 3' 3' . . . C↑GTACG . . . 5'
PstI	5' . . . CTGCA↓G . . . 3' 3' . . . G↑ACGTC . . . 5'
PvuII	5' . . . CAG↓CTG . . . 3' 3' . . . GTC↑GAC . . . 5'
SacI	5' . . . GAGCT↓C . . . 3' 3' . . . C↑TCGAG . . . 5'
SalI	5' . . . G↓TCGAC . . . 3' 3' . . . CAGCT↑G . . . 5'
SgsI	5' . . . GG↓CGCGCC . . . 3' 3' . . . CCGCGC↑GG . . . 5'
SmaI	5' . . . CCC↓GGG . . . 3' 3' . . . GGG↑CCC . . . 5'
VspI	5' . . . AT↓TAAT . . . 3' 3' . . . TAA↑T . . . 5'
XbaI	5' . . . T↓CTAGA . . . 3' 3' . . . AGATC↑T . . . 5'
XhoI	5' . . . C↓TCGAG . . . 3' 3' . . . GAGCT↑C . . . 5'
XmaJI	5' . . . C↓CTAGG . . . 3' 3' . . . GGA↑TC . . . 5'

3.1.6 Antikörper und Reagenzien

Antigen	Antikörper	Quelle
Westernblot		
AFP, human	Maus, monoklonal	Cell Signalling Technology (Danvers, USA)
CD247/CD3 ζ , Maus	murin, monoklonal	BD Bioscience Pharmingen (Heidelberg)
gp130, murin	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
PARP, human	Maus, monoklonal	BD Bioscience Pharmingen
STAT3, human	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
phospho-STAT3, human	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
β -Aktin, human	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology
IgG, murin	Ziege, HRP gekoppelt	Dianova (Hamburg)
IgG, Kaninchen	Ziege, HRP gekoppelt	Dianova
Immunfluoreszenz		
CD3 γ , human	Ziege	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
myc-Epitop	Hybridomüberstand 9E10	Institut für Infektionsmedizin (Kiel)
myc-Epitop	Kaninchen, monoklonal	HISS Diagnostics GmbH (Freiburg)
IgG (H+L), murin	Ziege, Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen
IgG (H+L), Kaninchen	Ziege, Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen
IgG (H+L), murin	Ziege, Alexa Fluor [®] 568	Invitrogen
IgG (H+L), Kaninchen	Ziege, Alexa Fluor [®] 568	Invitrogen
Durchflusscytometrie		
Isotyp, human	PE-konjugiert	BD Bioscience Pharmingen
ErbB2, human	PE-konjugiert	BD Bioscience Pharmingen
CD3, human	PE-konjugiert	BD Bioscience Pharmingen
CD4, human	PE-konjugiert	BD Bioscience Pharmingen
CD8, human	APC-konjugiert	BD Bioscience Pharmingen

Kits	Quelle
Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM)	Invitrogen
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo scientific (Rockford, USA)
CytoTox 96 [®] NonRadioactive Cytotoxicity Assay	Promega (Madison, USA)
DELTA [®] EuTDA Cytotoxicity Reagents	PerkinElmer (Boston, USA)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences Pharmingen
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche
mirVana [™] miRNA Isolation Kit	Ambion, Inc (Kaufungen)
PCR clean-up gel extraction: NucleoSpinExtract II	Macherey-Nagel (Düren)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Rotor-Gene Multiplex PCR Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo scientific
TOPO-TA-Klonierung	Invitrogen

Reagenzien, die in der folgenden Liste nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Reagenzien	Quelle
Accutase	PAA Laboratories (Coelbe)
Agar	Difco (Augsburg)
Agarose	Invitrogen
Alkaline Phosphatase	Thermo scientific
Ammoniumpersulfat	Amresco (Solon, USA)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Thermo scientific
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Greiner (Frickhausen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biomol (Hamburg)
DNase I	Roche
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories
Ficoll	Biochrom (Berlin)
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo scientific

Fortsetzung 2: Reagenzien

Reagenzien	Quelle
Glycerin	Gerbu Biochemicals (Gaiberg)
Hybond-C Extra	GE Healthcare (Freiburg)
IL-2 (Proleukin)	Chiron (Tuttlingen)
IL-6 (human)	Invitrogen
Insulin, bovin	Biochrom
L-Glutamin	PAA Laboratories
Lipofectamin	Invitrogen
Lipofectamin2000	Invitrogen
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad (München)
Nonidet P-40	Calbiochem (Schwalbach)
OptiMEM (serumfrei)	Invitrogen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo scientific
Panserin-401	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Proteaseinhibitor	Roche
Proteinlipid-Komplex	Biochrom
RNase A	Thermo scientific
RNase H	Thermo scientific
Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI)	PAA Laboratories
Superscript II Reverse Transkriptase	Life Technologies (Darmstadt)
Superscript III Reverse Transkriptase	Life Technologies
T4 DNA-Ligase	Thermo scientific
T4 DNA-Polymerase	Thermo scientific
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas
Trypan-Blau	Biochrom
Trypsin-EDTA	Biochrom
Wasser	DeltaSelect (Dreieich)

3.1.7 Medium und Puffer

Medien für Bakterien	Rezeptur
Luria-Bertani-(LB)-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
Luria-Bertani-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7
Medium zum Einfrieren	50 % LB-Medium; 50 % Glycerin
SOC-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 ml 1 M KCl; pH 7; 10 ml 1 M MgCl ₂ ; 20 ml 1 M Glucose
Medien für Zellkultur	Rezeptur
D10-Medium	DMEM (4 g/l Glucose); 10 % (v/v) FKS; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin
D10-Medium + G418	D10-Medium mit 200 µg/ml Geneticin
Ham's F-12	Ham's F-12 (PAA), 10 % (v/v) FKS; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin
Medium zum Einfrieren	90 % (v/v) FKS; 10 % (v/v) DMSO
OptiMEM	OptiMEM
R10-Medium	RPMI (PAA), 10 % (v/v) FKS; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin
R10-Medium ohne Phenolrot	RPMI ohne Phenolrot (PAA), 10 % (v/v) FKS; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin
R10-Medium + Insulin	R10-Medium mit Insulin (5 mg)
TC-Medium	45 % (v/v) RPMI; 45 % (v/v) Panserin-401; 10 % (v/v) FKS; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin
TC5-Medium	TC mit 5 U/ml IL-2
TC50-Medium	TC mit 50 U/ml IL-2

Puffer	Rezeptur
Blockpuffer (WB)	1x PBS; 0,05 % (v/v) Tween20; 5 % (w/v) Magermilchpulver oder 1x TBS; 0,05 % (v/v) Tween20; 5 % (w/v) BSA
DNA-Ladepuffer (6x)	50 % (v/v) Glycerin; 10 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Durchflussscytometer-PBS	1x steriles PBS; 0,1 % (w/v) Natriumazid; 5 % (v/v) FKS
Laemmli-Probenpuffer (2x)	124,8 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 0,008 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 20 % (v/v) Glycerin
Lysepuffer	0,5 % Tween-20, PE-Puffer, Proteinase K
Sortierungs-Puffer	PBS; 0,5 % BSA; 2 mM EDTA, pH 7,2
Natriumacetat	3 M Natriumazid pH 5,2
P1 (Minipräparation)	10 mM EDTA pH 8; 25 mM TRIS-HCl pH 8; 100 μ g/ml RNase A
P2 (Minipräparation)	0,2 M NaOH, 1 % SDS
P3 (Minipräparation)	3 M Kaliumacetat pH 5,5
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 64 mM Na_2HPO_4 ; 0,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,2 - 7,4
RIPA-Lysepuffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Natrium-Desoxycholsäure; 1 % (v/v) NP40
RIPA-PI	RIPA-Puffer mit einer Tablette complete mini (Protease-Inhibitoren, Roche)
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
Stripping-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 6,8; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2 % SDS
Transferpuffer	25 mM TRIS-HCl; 192 mM Glycin; 10 % Methanol
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	89 mM TRIS; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA
TRIS-buffered Saline (TBS)	50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2 - 7,4
Waschpuffer (WB)	1x PBS oder 1x TBS mit 0,05 % Tween20

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von DNA

Aufreinigung von BAC- oder Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Aufreinigung beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979]. *E. coli*-Zellen wurden über Nacht in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen sedimentiert (3.400 x g, 10 min, Raumtemperatur), in Puffer P1 resuspendiert und lysiert. Die enthaltene RNase A baute die einzelsträngige, bakterielle RNA ab und EDTA inaktivierte bakterielle Nukleasen. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe von Puffer P2 gestartet. NaOH schloss die Zellen auf und denaturierte die chromosomale DNA in Einzelstränge. Durch Puffer P3 erfolgte die Neutralisation und somit das Ende der Lyse. Die Plasmid-DNA renaturierte wieder, während die chromosomale DNA präzipitierte. Die Plasmid-DNA wurde in Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in einem letzten Schritt in molekular reinem Wasser gelöst und bei 4°C (für zeitnahe Transfektionen oder BAC-Verdau) oder bei -20°C gelagert.

Für die Pyrosequenzierung des Wildtyp-BACs von HVS C488 wurde eine DNA-Maxipräparation (Qiagen) durchgeführt. Das *Plasmid Maxi Kit* enthält ebenfalls die Puffer P1, P2 und P3, da die Aufreinigung ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Die Übernachtskultur der Zellen wurde bei 6.000 x g und 4°C für 15 min sedimentiert und nacheinander mit den Puffern versetzt. Der Überstand wurde nach der erneuten Zentrifugation (20.000 x g, 30 min, 4°C) auf eine äquilibrierte Ionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wurde gewaschen und im Anschluss wurde die BAC-DNA von der Säule eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte in Isopropanol mit anschließendem Waschen mit Ethanol. Die DNA wurde in molekular reinem Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

Aufreinigung viraler DNA aus Zellkulturüberständen

Virushaltige Zellkulturüberstände wurden bei 17.000 x g für 2 h bei 4°C abzentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde einem DNase I-Verdau (20 U) unterzogen. Somit wurde freie, unverpackte DNA entfernt. Nach Inaktivierung der DNase I erfolgten die Schritte entsprechend des *DNeasy Blood & Tissue*-Kit-Protokolls (Qiagen). Durch Zugabe von RNase A (100 µg/ml) und Proteinase K (20 mg/ml) wurden RNA-Fragmente und Kapsidproteine abgebaut. Nach Zugabe eines Lysepuffers (AL) und anschließend Ethanol wurde die Suspension auf eine DNeasy Mini-Spin-Säule gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde in zwei Wasch-

schritten gereinigt und dann getrocknet. Die DNA wurde mit AE-Puffer von der Säule eluiert. Durch eine Natriumacetat-Ethanol-Fällung wurde die DNA sedimentiert und dann in molekular reinem Wasser aufgenommen. Die virale DNA wurde im Anschluss mit entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht verdaut. Damit konnten rekonstituierte Viren auf Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) überprüft werden.

3.2.2 Klonierung

Fragmente für die Klonierungen wurden entweder frisch aus Zelllysaten amplifiziert und über das TOPO-TA-Klonierungskit in den pCR2.1-TOPO-TA-Vektor (Invitrogen) eingefügt oder aus einem schon vorhandenen Plasmid mittels Restriktionsenzymverdau gewonnen. Für die weitere Klonierung wurde der Vektor und das Insert (je 6 µg) mit entsprechenden Enzymen für 3 - 4 h verdaut, falls notwendig mit T4-DNA-Polymerase geglättet und der Vektor mit *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) oder hitzeempfindlicher alkalischer Phosphatase (FastAP) dephosphoryliert. Nach Trennung der Fragmente im Agarosegel (0,7 - 1%ig) wurden diese mit dem Kit *Nucleo Spin Extract II* nach Anleitung des Herstellers (Macherey-Nagel) isoliert. Die Ligation erfolgte entweder für 1 h bei überhängenden Enden oder über Nacht bei glatten Enden bei Raumtemperatur nach folgender Zusammensetzung:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \quad (3.1)$$

Der Ligationsansatz wurde mittels Transformation in kompetente DH5α oder XL1-blue *E. coli*-Zellen eingebracht. Die Überprüfung der Klone erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR).

Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde in dieser Arbeit für verschiedene Fragestellungen verwendet. Dazu zählen die Amplifizierung von DNA-Abschnitten aus Zelllysaten, die Überprüfung von neuen Klonen, das Umschreiben von mRNA in cDNA und der Nachweis von cDNA in einer Probe.

Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Bestandteile: 100 - 200 ng DNA, 1x PCR Puffer, 0,12 mM dNTPs, 0,2 mM MgCl₂, 0,5 µM von jedem Oligonuklotid und 1 U *Taq*-Polymerase (Fermantas). Für die PCR wurden je nach Fragestellung folgende Bedingungen festgelegt: 95°C für 4 min zur initialen Denaturierung und dann für 30 - 35 Zyklen 95°C 30 s, 52 - 62°C für 30 s und 72°C für 1 min/kb. Zur Denaturierung der Polymerase erfolgte am Ende ein Schritt von 72°C

für 10 min. Die Anlagerungstemperatur jeder PCR ist abhängig von den verwendeten Oligonuklotiden und wurde häufig von den Angaben des Herstellers (Biomers, Ulm) übernommen oder über folgende Gleichung näherungsweise bestimmt:

$$T_M = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2] \text{ (in } ^\circ\text{C)} \quad (3.2)$$

Die Amplifikation für eine Sequenzierungsreaktion oder von Fragmenten aus Zelllysaten erfolgte mit Hilfe der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (Finzyme), da diese eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Ein Ansatz bestand aus folgenden Bestandteilen: 0,12 mM dNTPs, 1x GC- oder HF-Puffer, 3 - 5 % DMSO (bei GC-reichen Sequenzen), 0,4 U *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen waren: 98°C für 1 min, 35 - 40 Zyklen bei 98°C für 10 s, 55 - 65°C für 30 s und 72°C für 20 s/kb.

Sequenzierung

Die Zwischen- und Endkonstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die gewünschten Fragmente amplifiziert, im Agarosegel (0,7 - 1%ig) aufgetrennt und aus diesem aufgereinigt. Der anschließende Sequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1/10 BigDye Version 1.1, 0,5x Sequenzierungspuffer und 0,5 µM eines Oligonukleotids. Das Sequenzierungsprogramm im Thermocycler T3 startete mit einer Denaturierung für 1 min bei 96°C. Danach folgten 25 Zyklen bei 96°C für 10 s, 50°C für 5 s und 4 min bei 60°C. Die Aufreinigung der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden in Kapillar-Sequenziergeräten (DNA Analyser 3700, Applied Biosystems) des Instituts für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein aufgetrennt und mittels ContigExpress, einer Komponente der Software Vector NTI 10.3 (Invitrogen), analysiert.

3.2.3 En passant-Mutagenese

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Für die *En passant*-Mutagenese werden elektrokompetente *E. coli*-Zellen benötigt. Zu ihrer Herstellung wurde LB-Medium aus einer Übernachtskultur angeimpft. Befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (optische Dichte (A_{600} 0,5 - 0,7)), wurden sie für 15 min bei 42°C geschüttelt und danach sofort für 20 min auf dem Orbitalschüttler in einem Eisbad inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert und dreimal mit eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 1/100 des Anfangsvolumen 10%igem Glycerin aufgenommen und in kleinen Portionen in einem Ethanol-Trockeneisbad eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Elektroporation und erste Red-Rekombination

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100 ng DNA vermengt. Die Suspension wurde in eine 1 mm-Küvette (Biorad) gegeben und unter folgenden Bedingungen elektroporiert: 1.500 V, 25 μ F und 200 Ω . Danach wurde sofort 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben und diese werden für 2 h bei 32°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden 1/10 und 1/20 der Suspension auf Agarplatten mit 30 μ g/ml Chloramphenicol und 30 μ g/ml Kanamycin ausplattiert und für 48 h im Brutschrank bei 32°C inkubiert.

Zweite Red-Rekombination

Nach der Überprüfung einer Kolonie aus der ersten Red-Rekombination mittels RFLP wurde diese in 2 ml Medium (LB-Medium mit 30 μ g/ml Chloramphenicol) bei 32°C und 200 rpm bis zu A_{600} von 0,5 - 0,6 angezogen. Nach Zugabe von 2 ml LB-Medium mit demselben Antibiotika und 1 % Arabinose wurde die Suspension für eine weitere Stunde geschüttelt. Die Expression des Red-Rekombinationssystems wurde im Anschluss daran bei 42°C und 220 rpm für 30 min im Wasserbad induziert. Vor dem Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit 30 μ g/ml Chloramphenicol und 1 % Arabinose wurden die Zellen erneut bei 32°C und 220 rpm für 2 - 4 h kultiviert. Die Anzucht der Klone erfolgte bei 32°C über 48 h im Brutschrank.

3.2.4 RNA-Analysen

RNA-Isolation

Zelluläre RNA wurde mit der Trizol-Chloroform-Extraktion isoliert. Adhärenente Zelllinien wurden durch Accutase vom Gefäßboden gelöst und abzentrifugiert (260 x g, 10 min), bei Suspensionszellen entfiel der Accutaseschritt. Die Zellen wurden in Trizol (Invitrogen) aufgenommen und im Anschluss daran zusätzlich mit Chloroform versetzt. Nach der Präzipitation wurde die RNA mit Isopropanol gefällt RNA mit Ethanol gewaschen und im Anschluss in molekular reinem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

cDNA-Synthese und Reverse-Transkriptase-PCR

Für einen anschließenden Nachweis der mRNA-Spiegel in den Zellen wurde die Gesamt-RNA einem DNase I-Verdau unterzogen. Nach Hitze-Inaktivierung der DNase I erfolgte die cDNA-Synthese. Dazu wurde die Probe in zwei gleiche Portionen (mit und ohne Reverse Transkriptase) geteilt und mit folgenden Reagenzien versetzt: 1 μ g Oligo(dT)₁₈ und 0,5 μ M dNTPs. Die Suspension wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1x Transkriptionspuffer und 5 mM DTT erfolgte eine Erwärmung auf 42°C.

Bei 50 % der Ansätze wurde 200 U Superscript II Reverse Transkriptase (Life Technologies) hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 50 min. Die gewonnene cDNA wurde durch eine PCR auf Ziel-mRNAs hin analysiert.

miRNA-Isolation

Die miRNA-Isolation erfolgte mittels *mirVana*[™] miRNA Isolationskit entsprechend den Herstellerangaben (Ambion). Gereinigte Gesamt-RNA wurde mit Lyse-Bindpuffer und miRNA-Homogenat-Zusatz versetzt und für 10 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 100 % Ethanol wurde die Probe gründlich gemischt. Die Suspension wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben und das Filtrat aufgefangen. Zum Filtrat wurde erneut 100 % Ethanol gegeben, der Ansatz wurde gemischt, auf eine Säule gegeben und zentrifugiert. Diesmal wurde das Filtrat verworfen. Nach dreimaligem Waschen des Filters wurde die miRNA von der Säule eluiert. Die gewonnene miRNA wurde im Northernblot am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg eingesetzt, weil das Institut für Infektionsmedizin in Kiel keine Umgangsgenehmigung für Radioaktivität besitzt.

Stamm-Schleifen-Echtzeit-RT-PCR

Die Methode der Stamm-Schleifen-Echtzeit-RT-PCR (*stem loop real time RT-PCR*) wurde 2005 zur Quantifizierung von microRNAs entwickelt [Chen et al., 2005]. Die Methode beruht auf der Verwendung eines Stamm-Schleifen-Oligonukleotids zur Synthese der cDNA und der anschließenden Quantifizierung der Transkripte durch Echtzeit-PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden. TaqMan-Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende einen Reporter-Fluorescein-Farbstoff und an seinem 3'-Ende ein Quencher trägt. Wenn sich die TaqMan-Sonde an ihre Zielsequenz anlagert und die Probe angeregt wird, wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Quencher unterdrückt. Nach Synthese der Zielsequenz und der damit verbundenen Verdrängung und des Abbau der TaqMan-Sonde wird die räumliche Nähe aufgehoben und die Fluoreszenz wird messbar.

Im ersten Schritt wurde die RNA durch die Superscript III Reverse Transkriptase (Life Technologies) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit 1x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT, 20 U RNaseOut und 50 U Superscript III Reverse Transkriptase versetzt und die cDNA in 60 Zyklen synthetisiert. Der Abbau der RNA erfolgte durch die Zugabe von 80 U RNase H. Für den Nachweis der enthaltenen 5p-HSUR2 von HVS C488 wurden zur synthetisierten cDNA 0,5 µM Oligonukleotide, 0,2 µM TaqMan-Sonde und 1x Mastermix zugegeben und die Stamm-Schleifen-Echtzeit-PCR mit 45 Zyklen im Rotor-Gene 6000 (Qiagen) in Duplikaten gestartet.

Als Normalisierungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Die Auswertung erfolgte durch die Rotor-Gene 6000 Software (Qiagen).

3.2.5 Protein-Analysen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Zellen auf ihre Proteinexpression hin untersucht. Dazu wurden adhärenente Zellen mit Accutase vom Zellkulturboden gelöst und abzentrifugiert, Suspensionszellen wurden nur abzentrifugiert (jeweils 260 x g, 10 min). Die Sedimente wurden in eiskaltem RIPA-Puffer mit 1x Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) und Benzonase (Merck) aufgenommen und für 20 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 2x Laemmli-Puffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol wurden die Lysate bei -20°C gelagert.

Vor einer Auftrennung in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben auf Eis aufgetaut, für 10 min bei 95°C gekocht, kurz auf Eis gelagert und abzentrifugiert. Als Größenstandard diente eine *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Die Wanderung im Sammelgel erfolgte bei 10 mA und 400 V, nach dem Übergang ins Trenngel (8, 10 oder 12%ig) bei 15 mA bis die Bromphenolblaubande das Gel verlassen hatte.

Westernblot

Im Anschluss an die Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine elektrophoretisch in einem Semidry-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 μ m) übertragen. Dazu wurden die Membran und das Gel mit 1x Transferpuffer (mit 10 % Methanol) behandelt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 12 V und 400 mA für 45 - 60 min. Die Membran wurde im Anschluss für 1 h (Raumtemperatur) oder über Nacht (4°C) in Blockpuffer gelagert. Nach einem kurzen Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:1.000 - 1:2.000) für 1 h (Raumtemperatur) oder über Nacht (4°C). Die Membran wurde dann in sechs Schritten á 5 min gewaschen und danach mit dem zweiten, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem, Antikörper (1:8.000) inkubiert. Nach weiteren Waschschriften erfolgte die Detektion mit SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrat (Pierce) durch die Chemilumineszenz-Reaktion am Image-System LAS-3000 (Fujifilm, Tokio).

In einigen Experimenten wurde die Membran im Anschluss im *Stripping*-Puffer für 15 min auf 65°C erhitzt. Danach wurde das β -Mercaptoethanol durch Waschen entfernt, die Membran erneut mit Blockpuffer behandelt und wie oben beschrieben mit Antikörpern inkubiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultur

Zellen auftauen

Die bei -80°C gelagerten Proben der Zelllinien wurden schnell auf 37°C erwärmt, in 10 ml entsprechenden Mediums aufgenommen und für 10 min bei $260 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Medium aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Primäre T-Lymphozyten wurden aus -80°C ebenfalls schnell erwärmt und in 10 ml R10-Medium zentrifugiert. Die Zellen wurden in R10-Medium mit $4 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 . Die Kulturflaschen wurden durch Anhebung am Flaschenhals in Schräglage von ca. 30° gehalten. Am folgenden Tag wurde das Volumen durch die Zugabe von TC50-Medium verdoppelt.

Zellen kultivieren

Die verschiedenen Medien wurden zur Kultivierung folgender Zellen verwendet:

Medium	Zelllinien
D10	Hep3B, HepG2, Huh7, Huh7.5, MDA-MB231, MDA-MB453, MDA-MB468, NIH3T3, OMK, SKBR3, SK-Hep1
D10+G418	NIH3T3-ErbB2
Ham's F12	CHO-K1
R10	AKN1, BAF3, BT20M, B222, CB15, HuccT1, Jurkat-Zellen, KL, MCF7, Renca, SKOV-3, T47D
R10+Insulin	ZG
TC5	humane T-Lymphozyten
TC50	humane T-Lymphozyten

Zellen einfrieren

Die adhärenenten Zelllinien wurden mit Trypsin-EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Alle Zelllinien wurden bei $260 \times g$ für 10 min zentrifugiert und in 100%igem FKS (ca. 2×10^6 Zellen pro ml) aufgenommen, resuspendiert und für 10 min auf Eis gelagert. Im Anschluss

erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen 100 %igem DMSO. Die Suspension wurde in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen pipettiert, für 24 h in einer Isopropanol-Einfrierbox (Abkühlung ca. $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) bei -80°C gelagert und danach in Kryoboxen bei -80°C überführt.

Lymphozytenisolierung aus humanen Blutproben

Humane Blutproben wurden 1:1 mit PBS verdünnt. In einer Dichtegradientenzentrifugation ($1.200 \times g$ für 30 min) wurden 35 ml verdünnte Blutprobe über 15 ml Ficoll aufgetrennt. Die Leukozyten befanden sich danach in der Interphase zwischen Ficoll und Serum, wurden abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. Nach einer Zellzahlbestimmung in der Neubauer-kammer wurden die Zellen in FKS mit 10 % DMSO wie oben beschrieben weggefroren oder weiter kultiviert.

Induktion mit Doxycyclin

Wenn die Zielzellen mit einem rekombinanten Virus mit Tet-Schalter transduziert waren, wurden sie zur Hochregulation der Transgenexpression 6 h bzw. 24 h vor ihrer Weiterverarbeitung mit $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin stimuliert.

3.3.2 Transfektion und Viruskultur

Transfektion

Am Vortag wurde die BAC-DNA für das entsprechende Virus jeweils frisch präpariert und $5,5 \times 10^5$ OMK-Zellen wurden in einer 25 cm^2 -Kulturflasche ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 40 - 60 %. Die BAC-DNA (ca. $5 \mu\text{g}$ in $200 \mu\text{l}$) und das Lipofectamin ($10 \mu\text{l}$ in $200 \mu\text{l}$) wurden in zwei Ansätzen mit OptiMEM verdünnt. Nachdem beide Lösungen zusammengegeben worden waren ($400 \mu\text{l}$), wurden sie für 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die OMK-Zellen zweimal mit OptiMEM gewaschen. Nach der Zugabe von OptiMEM ($1,1 \text{ ml}$) zu dem Inkubationsansatz wurde dieser auf die Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde $1,5 \text{ ml}$ D10-Medium zugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit neuem D10-Medium (5 ml).

Nach einer täglichen optischen Kontrolle wurden die Zellen nach ca. 5 d, wenn deutliche cytopathische Effekte zu sehen waren, trypsiniert und in eine größere Zellkulturflasche überführt. Wenn diese Zellen komplett durchinfiziert waren und die meisten Zellen abgelöst waren, wurde der Überstand geerntet, zentrifugiert und bei 4°C gelagert. OMK-Zellen wurden in einer 175 cm^2 -Kulturflasche ausgesät und am folgenden Tag mit virushaltigem Überstand in 5 ml Me-

dium für 2 h unter mehrmaligem Schwenken bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und nach Zugabe von neuem D10-Medium für mehrere Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert bis auch diese Flasche durchinfiziert war und der Überstand nach Zentrifugation bei -80°C weggefroren werden konnte. Virale Konstrukte mit den proapoptischen Transgenen tBid oder reverse Caspase 3 wurden im Vermehrungsschritt bei 32,5°C kultiviert.

Titration

Die Titration dient der Bestimmung der Konzentration der infektiösen Viren. Dazu wurden am Vortag OMK-Zellen in 24er-Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät. Triplikate von sechs seriellen 10-fach-Verdünnungen der einzelnen Viren wurden angelegt (10^{-1} - 10^{-6}), indem in D10-Medium jeweils 1:10 der vorherigen Verdünnungsstufe gegeben wurde, gefolgt von kräftigem Mischen. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 100 µl in eine Vertiefung gegeben. Am nächsten Tag wurde der Überstand gegen 1 ml neues D10-Medium gewechselt. Nach weiteren 6 - 10 d wurden die entstandenen cytopathischen Effekte (Plaques) gezählt. Die Berechnung der Plaque-bildenden Einheiten (*plaque forming units*, PFUs) pro ml erfolgte durch:

$$\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0,1 \text{ ml}} \quad (3.3)$$

Kinetik

Kinetiken wurden zur Bestimmung des Replikationsverhaltens der Viren durchgeführt. Am Vortag wurden OMK-Zellen in 24er-Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät. Für jeden Messzeitpunkt wurde eine definierte Anzahl an PFUs in eine Vertiefung gegeben, für 1 h unter mehrmaligem Schwenken bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und danach dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen mit 1 ml Medium überschichtet. Der Überstand wurde zu definierten Zeitpunkten (1, 2, 3, 4, 5 und 6 d nach der Infektion; *days post infection*, dpi) geerntet und bei -80°C gelagert. Die PFUs pro Messzeitpunkt wurden in einer anschließenden Titration bestimmt.

3.3.3 Transduktion von Zielzellen

Humane Lymphozyten wurden 3 d nach der Stimulation durch Concanavalin A gezählt und in einem 50-ml-Röhrchen mit Virus vermischt (ca. 3×10^6 Zellen mit Infektionsmultiplizität (MOI=3)). Die Zellsuspension wurde für 2 h bei 26°C und 460 x g zentrifugiert (Spinokulation)

[Stevenson et al., 2000]. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in neuem TC50-Medium aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Adhärenz Zellen wurden am Vortag in Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Zugabe der entsprechenden Viren (meistens MOI=1) wurden die Platten für 2 h bei 26°C und 460 x g zentrifugiert und im Anschluss das Medium gewechselt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂.

3.3.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Das Fluoreszenzmikroskop IX81 (Olympus, Hamburg) wurde für verschiedene Fragestellungen verwendet.

Überprüfung der Transgenexpression

Die eGFP-Expression der transduzierten Hepatomzelllinien und humanen T-Lymphozyten und die dsRed-Expression der Hamsterzellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Immunofluoreszenz von Effektor-T-Lymphozyten

Transduzierte humane T-Lymphozyten wurden auf mit L-Laminin und Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (jeweils 10 µg/ml) mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Nach dem einstündigen Blocken mit 10 % normalem Ziegsenserum wurden die Zellen mit Überstand des Hybridoms 9E10, das gegen das Myc-Epitop gerichtet ist, und einem Kaninchenantikörper anti-CD3γ für 1,5 h inkubiert. Nach Waschschritten erfolgte die Zugabe der markierten Antikörper Alexa-488-α-Maus und Alexa-568-α-Kaninchen (beide 1:1.000; Invitrogen) für 1 h. Nach erneuten Waschschritten wurden Zellkerne mittels DAPI (Greiner) angefärbt. Die Proben wurden in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die Immunfluoreszenz der T-Lymphozyten fanden die Filter für FITC (488 nm), dsRed (568 nm) und DAPI (358 nm) Verwendung.

Live-cell-imaging Versuche

Zur Visualisierung der Funktionalität der cTCR-transduzierten T-Lymphozyten wurde die Tumorzelllinie MDA-MB453 mit 1 µM Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM, Invitrogen), einem veresterten Fluoresceinkomplex, für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Zugabe von T-Lymphozyten (WT^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) im Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1 wurden die Zellen im Inkubator des *live-cell-imaging*-Fluoreszenzmikroskops für 3 h bei 37°C inkubiert und beobachtet. Alle 15 min wurden die gleichen Zellen fotografiert und so eine Veränderung der Fluoreszenz über die Zeit dargestellt.

TUNEL-Test

Für den TUNEL-Test (terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase-vermittelter dUTP-Biotin End-Markierungstest, *terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*, Roche) wurden die Zelllinien (Huh7.5, Hep3B, SK-Hep1) in 96-Flachbodenplatten ausgesät, mit Virus (WTf Δ 1^{rHVS}, hCBF Δ 1^{rHVS} und AhCBF Δ 1^{rHVS}) transduziert und nach einer Woche für 6 h mit Dox induziert. Die Färbung folgte dem Protokoll des *InSitu Cell Death Detection Kits* (Roche). Das Medium wurde fast vollständig abgenommen und die Zellen mit einer 4%igen Formaldehydlösung mit Triton-X100 für 10 min fixiert. Nach einem Waschschriff wurde mit einer Reaktionslösung aus Enzym- und Markierungslösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit DAPI-Kernfärbungslösung für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach weiteren Waschschriffen.

3.3.5 Durchflusscytometrie

Das Durchflusscytometer (FACSCanto, BD Biosciences) wurde für verschiedene Fragestellungen verwendet.

Phänotyp von T-Lymphozyten und Tumorzellen

Über den gesamten Versuchszeitraum des Projektes „rekombinanter T-Zell-Rezeptor“ hinweg wurden die transduzierten T-Lymphozyten auf ihre Oberflächenmarker untersucht. Dazu wurden die Zellen in Durchflusscytometrie-Puffer aufgenommen, mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert und danach im Durchflusscytometer detektiert. Ebenso wurden die Tumorzellen auf ihre ErbB2-Expression untersucht, indem sie mit einem spezifischen Antikörper markiert und im Anschluss per Durchflusscytometrie analysiert wurden.

Nachweis der induzierten Apoptose

Für den Nachweis der induzierten Apoptose wurde das Kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Bioscience Pharmingen) verwendet. Die verschiedenen adhärenenten Zelllinien wurden für eine anschließende Analyse im Durchflusscytometer mittels Accutase von dem Kulturgefäßboden abgelöst, abzentrifugiert, gewaschen und in Bindepuffer aufgenommen. Die Suspensionszelllinien konnten sofort abzentrifugiert und umgepuffert werden. Eine Probe wurde in zwei Ansätze aufgeteilt. Ansatz 1 diente als Kontrolle während Ansatz 2 mit 5 µl FITC Annexin V und 5 µl Propidiumiodid, entsprechend den Herstellerangaben, versetzt wurde. Die

Proben wurden gemischt, für 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und im Anschluss im Durchflussscytometer analysiert. Die Färbung mit Annexin V weist ein frühes Apoptosestadium nach, die Färbung der Zellen mit Propidiumiodid ein späteres Stadium.

Überprüfung der Transgenexpression

Die eGFP-Expression der transduzierten Hepatomzelllinien und humanen T-Lymphozyten sowie die dsRed-Expression der transduzierten Hamsterzellen wurde mittels Durchflussscytometers quantitativ bestimmt.

3.3.6 Cytotoxizitätstests

BATDA-Europium-Cytotoxizitätstest

Diese Methode basiert auf dem Markieren der Tumor-Ziel-Zellen mit einem Acetoxymethylester eines fluoreszenzverstärkenden Chelator-Liganden (BATDA). Dieser Ligand gelangt schnell durch die Zellmembran in die Zelle, wo die Esterbindungen hydrolysiert werden und sich der hydrophile Ligand (TDA) bildet, der nicht länger die Membran passieren kann. Nach Lyse der Zielzellen durch die Anwesenheit der Effektorzellen tritt der Ligand aus und bildet mit den zugegebenen Europiumionen einen Chelatkomplex. Das gemessene Fluoreszenzsignal korreliert direkt mit der Menge der lysierten Zellen.

Zielzellen wurden geerntet und mit dem Chelator BATDA (Perkin-Elmer) inkubiert. Die markierten Zellen (KL1, KL2, KL5, KL6, MDA-MB453, MDA-MB468, SKOV3, T47D, ZG17) wurden in Triplikaten in definierten Verhältnissen (1:40; 1:20; 1:10; 1:5; 1:2,5) mit den Effektor-T-Zellen (WTf^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}, scfr-ULT^{rHVS}) vermischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde im Anschluss mit der Europiumlösung (Perkin-Elmer) versetzt und im Mikroplattenleser Safire2 (Tecan, Crailsheim) bei 490 nm gemessen. Triplikate mit einem Verhältnis von 10:1 wurden außerdem mit 100 nM Concanamycin A (CMA, Sigma Aldrich) versetzt, einen Inhibitor der perforinabhängigen Zelllyse [Kataoka et al., 1996]. Die Grundlage für die Berechnung der prozentualen Cytotoxizität wird durch die folgende Gleichung mathematisch beschrieben:

$$\% = \frac{\text{Ergebnis} - \text{Effektorzellen}_{\text{spontane Freisetzung}} - \text{Zielzellen}_{\text{spontane Freisetzung}}}{\text{Zielzellen}_{\text{maximale Freisetzung}} - \text{Zielzellen}_{\text{minimale Freisetzung}}} \times 100 \quad (3.4)$$

Laktatdehydrogenase-Test

Dieses Verfahren ermöglicht die Quantifizierung der Laktatdehydrogenase (LDH), eines stabilen cytosolischen Enzyms, das bei der Zelllyse freigesetzt wird. Freigesetzte LDH in Kulturüberständen wird durch einen Enzym-gekoppelten Test (*Cytotox96 NonRadioactive Cytotoxicity Assay*, Promega) gemessen, der in der Umwandlung eines Tetrazoliumsals (INT) in ein rotes Formazan-Produkt mündet. Die Intensität des Farbkomplexes ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Dieser Test wurde bei zwei Fragestellungen in dieser Arbeit verwendet:

1. Zur Bestimmung der Cytotoxizität des chimären T-Zell-Rezeptors wurden die Zielzellen (KL1, KL2, KL5, KL6, MDA-MB453, MDA-MB468, SKOV3, T47D, ZG17) in Triplicaten in definierten Verhältnissen (1:10; 1:5; 1:2,5; 1:1,25) zu Effektor-T-Lymphozyten (WT^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) gegeben. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C wurde der Überstand mit einer Testpuffer-Substrat-Lösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Stopplösung beendet und die Ansätze bei 490 nm im Mikroplattenleser Safire2 vermessen.
2. Die Hepatomzellen (Hep3B, Huh7.5, SK-Hep1) wurden in Quadruplikaten in 96-Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag mit Viren (WT Δ 1^{rHVS}, hCBF Δ 1^{rHVS}, AhCBF Δ 1^{rHVS}) transduziert. Nach einer Woche erfolgte die Zugabe von Doxycyclin und 24 h später die Ernte und Prozessierung der Überstände wie oben beschrieben.

Nach Subtraktion des Hintergrunds und der Volumenkorrelation, wurde die Gleichung 3.4 für die Auswertung verwendet.

Freisetzung cytotoxischer Granula

Granzym B ist eine Serinprotease, die in humanen T-Lymphozyten exprimiert und in lytischen Granula gelagert wird. In der Anwesenheit von Tumorzellen werden die Granula der T-Zellen über Exocytose freigesetzt. In diesem Test wird nach Coinkubation der Effektor- und Zielzellen der Überstand mit einem Gemisch von Benzyloxycarbonyl-L-Lysin-Thiobenzylester (BLT) und 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzol-Säure) (DTNB/Ellman-Reagenz) versetzt. BLT dient als Substrat von Granzym B. Bei der Umsetzung entstehen freie Thiolgruppen, die durch DTNB mittels Farbumschlags quantitativ nachgewiesen werden.

Die Zielzellen (KL1, KL2, KL5, KL6, MDA-MB453, MDA-MB468, SKOV3, T47D, ZG17) wurden in Triplikaten im Verhältnis von 1:10 mit Effektorzellen (WT^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) vermischt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde mit BLT und DTNB vermischt und nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Proben bei 405 nm im Mikroplattenleser Safire2 vermessen. Als Grundlage für die Berechnung der prozentualen spezifischen Granulafreisetzung wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\% = \frac{\text{Absorption}_{\text{experimentell}} - \text{Absorption}_{\text{spontan}}}{\text{Absorption}_{\text{maximal}} - \text{Absorption}_{\text{minimal}}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.3.7 Magnetische Zellsortierung

Eine heterogene Population von T-Lymphozyten wurde einen Monat nach ihrer Transduktion in CD4⁺- und CD8⁺-Zellen separiert. Dazu wurden die Zellen mit einem Biotin-Antikörper-Cocktail (Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD123, TCR γ/δ and Glycophorin A) (*CD4⁺-Cell Isolation Kit II* Miltenyi Biotec) für 10 min bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von Anti-Biotin-Mikrokügelchen für 15 min ebenfalls bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension auf eine äquilibrierte Säule in einem magnetischen Separator gegeben. Der Durchfluss enthielt die unmarkierten CD4⁺-T-Zellen. Die markierten Zellen wurden nach Entfernen des Magneten von der Säule gewaschen und parallel weiterkultiviert. Die unmarkierten Zellen wurden erneut nach oben genanntem Schema sortiert und danach weiterkultiviert. Nach weiteren zwei Monaten wurden die CD4⁺-Zellen erneut sortiert, die markierten Zellen wurden diesmal nicht weiterverwendet. Die Effizienz dieser magnetischen Zellsortierung wurde im Durchflusscytometer überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinanter T-Zell-Rezeptor auf humanen T-Lymphozyten

Die stabile Expression eines Transgens, das über einen HVS-Vektor *in vitro* in Zellen eingebracht worden ist, konnte bisher nur für die Thymidinkinase aus HSV-1 über einen längeren Zeitraum gezeigt werden [Hiller et al., 2000]. In anderen Versuchen stieg die Proteinexpression zu Beginn an, fiel jedoch nach einigen Wochen wieder ab [Hüske, 2010; Toptan et al., 2010a, Toptan, 2010b]. Ein entscheidendes Ziel dieses Projektes ist demnach die stabile Langzeitexpression von Transgenen in HVS-transformierten humanen T-Lymphozyten.

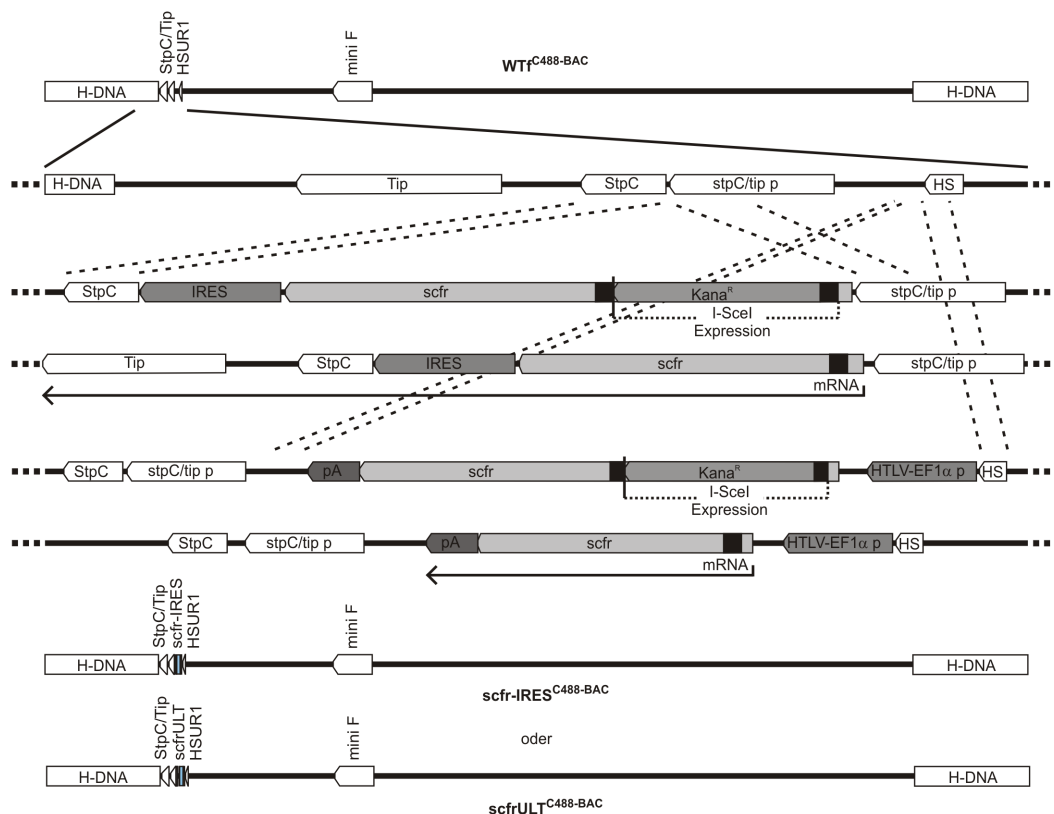


Abb. 4.1: Rekombinante Viren aus WTf^{C488}-BAC mit rekombinantem T-Zell-Rezeptor. ^{C488}-BAC: BAC; HSUR1/HS: HVS-U-RNA 1; HTLV-EF1α p: Fusionspromotor aus dem Promotor des humanen T-lymphotropen Virus Typ 1 und dem Promotor für den Elongationsfaktor 1α; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; Kana^R: Kanamycin-Resistenzkassette; p: Promotor; pA: polyA-Sequenz; scfr: variables Einzelkettenfragment; scfr-IRES^{C488}-BAC: BAC mit tricistronischer Variante; scfrULT^{C488}-BAC: BAC mit separater Expressionsvariante; StpC: Saimiri-transformationsassoziiertes Protein der Untergruppe C; Tip: Tyrosinkinase-interagierendes Protein.

Als Transgen diente ein cTCR, dessen Funktionalität in vielen Vorarbeiten bereits ausführlich dokumentiert war [Moritz et al., 1994]. Dieser cTCR besitzt eine Antigenbindestelle für den humanen Wachstumsfaktor-Rezeptor ErbB2, der auf der Zelloberfläche einer Vielzahl humaner Tumorzellen, u.a. auf Mammakarzinomen [Berger et al., 1988], überexprimiert wird. Ziel ist es, infolge der Bindung der T-Lymphozyten über den cTCR an die Tumorzellen durch die räumliche Nähe eine Aktivierung der T-Zellen mit anschließender Lyse der Tumorzellen zu induzieren.

4.1.1 Virusvektoren für den chimären T-Zell-Rezeptor

Das BAC $Wt^{\text{C488-BAC}}$ enthält das vollständige HVS-Genom mit einem mini-F-Fragment aus pBeloBAC11 an der Position des viralen *ORF14*. Dieses BAC wurde in *E. coli*-Zellen durch *En passant*-Mutagenese verändert. Das inserierte Konstrukt bestand aus der codierenden Sequenz für einem scFv gegen ErbB2 fusioniert mit der CD3 ζ -Domäne (CD247) eines natürlichen TCRs. Dieses Transgen wurde einerseits zwischen das biscistronische *stpC/tip*-Gen (*ORF1*) und seinen Promotor mit einer zusätzlichen internen ribosomalen Eintrittsstelle (*internal ribosome entry site*, IRES) aus dem Enzephalomyokarditis-Virus kloniert, wodurch eine tricistronische Transkriptionseinheit entstand ($\text{scfr-IRES}^{\text{C488-BAC}}$); andererseits wurde das Transgen vor den *stpC/tip*-Promotor als separate Transkriptionseinheit unter einem chimären Promotor inseriert ($\text{scfrULT}^{\text{C488-BAC}}$), der aus Elementen des Enhancers und Promotors des Humanen T-lymphotropen Virus (HTLV-1) und des Promotors für den Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) besteht [Abb. 4.1].

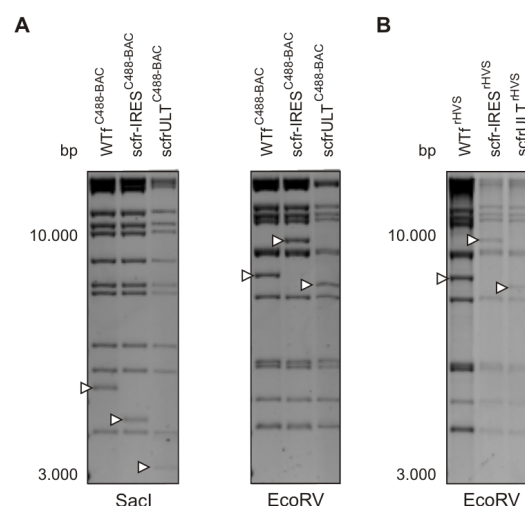


Abb. 4.2: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse von BAC- und Virus-DNA. Die Pfeilspitzen deuten auf die Unterschiede in den Bandenmustern hin. **A** Verdau der BAC-DNA mit *SacI* und *EcoRV*. **B** Verdau der Virus-DNA mit *EcoRV*. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare.

Die erfolgreiche Rekombination der Transgen-Konstrukte in den $WTf^{C488-BAC}$ und die anschließende Deletion der Kanamycin-Resistenzkassette, die als Selektionsmarker diente, wurden durch RFLP-Analyse überprüft. Dazu wurden die BAC-enthaltenden Bakterien vermehrt, die Plasmid-DNA wurde daraus aufgereinigt und im Anschluss daran verdaut. Das Bandenmuster wurde auf seine Veränderungen hin überprüft [Abb. 4.2A]. Ein positiver Klon von jedem Konstrukt wurde ausgewählt. Durch Lipofectamin-Transfektion wurde die BAC-DNA in permissive OMK-Zellen eingebracht und der Virusvektor wurde rekonstituiert. Auch dieser Schritt wurde durch eine RFLP-Analyse verifiziert [Abb. 4.2B]. Die im Anschluss erstellten Replikationskinetiken der Viren über 6 d dienten dazu, ein eventuelles Replikationsdefizit aufzudecken. Die beiden Virusvektoren mit dem inserierten cTCR zeigten jedoch das gleiche Replikationsverhalten wie das Wildtypvirus (WT^{HVS}) und das Wildtypvirus mit mini-F-Fragment (WTf^{HVS}) [Abb. 4.3].

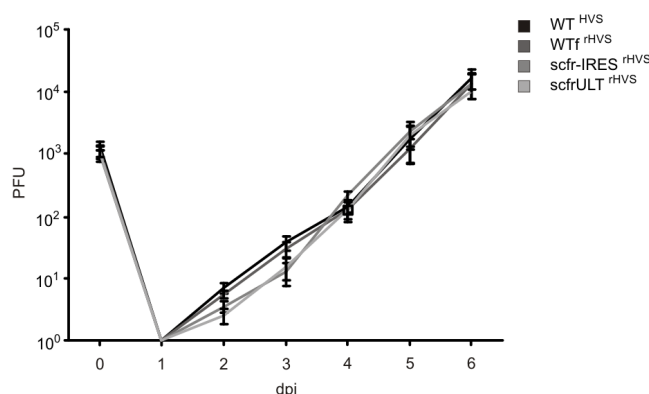


Abb. 4.3: Replikationsskinetiken der rekonstituierten Viren. Die Replikation der verschiedenen Viren über 6 d zeigt das Wildtypvirus WT^{HVS} , das Wildtypvirus mit mini-F-Fragment WTf^{HVS} , das Virus mit tricistronischer Transkription $scfr-IRES^{HVS}$ und das Virus mit separater Transkription $scfrULT^{HVS}$. dpi: Tage nach der Infektion; PFU: Plaque-bildende Einheiten.

Aus Blutspenden (*buffy coats*) isolierte humane Lymphozyten verschiedener freiwilliger Personen (K10, K32) wurden mit $MOI=3$ mittels Spinokulation [Stevenson et al., 2000] mit den Virusvektoren WTf^{HVS} , $scfr-IRES^{HVS}$ und $scfrULT^{HVS}$ transduziert und im Anschluss kultiviert. Nach drei Monaten wurden die Effektor-T-Zellen auf die Expression ihre Oberflächenmoleküle hin untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 markiert und im Durchflusscytometer vermessen. Dabei zeigten sich homogene Populationen von $CD8^+-CD3^+$ -T-Lymphozyten [Abb. 4.4B, C]. Für ihre Verwendung in den Funktionalitätstests wurde zusätzlich die humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB453 auf ihre ErbB2-Expression untersucht. Die Expression war sehr

ausgeprägt und somit geeignet, als Ziel für den cTCR auf den T-Lymphozyten zu dienen [Abb. 4.4A].

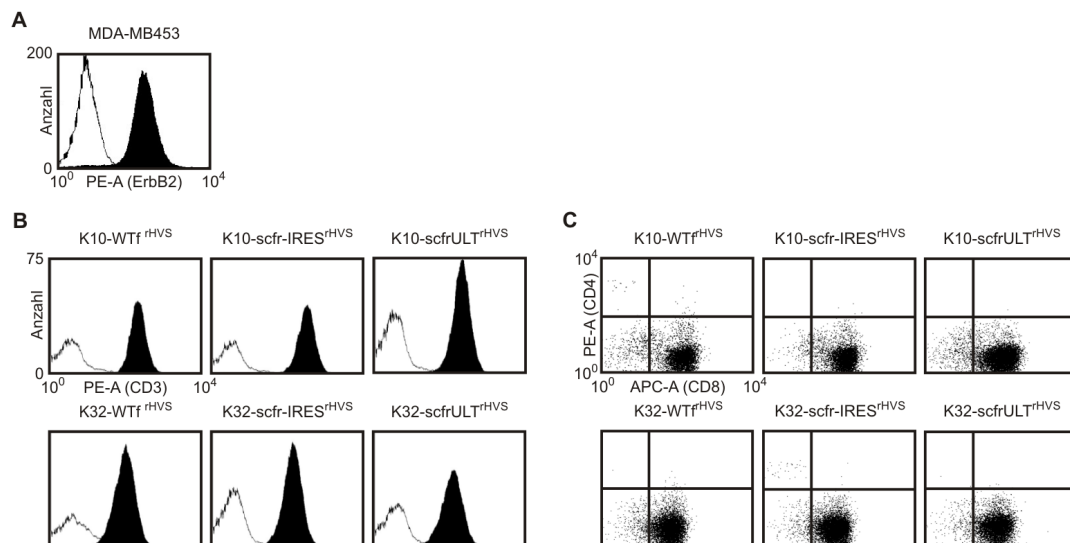


Abb. 4.4: Expression von Zelloberflächenmolekülen auf Effektor- und Zielzellen. **A** Die Zielzelle MDA-MB453 wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ErbB2 für 1 h im Dunkeln auf Eis markiert und im Durchflusscytometer untersucht. Die Effektorzellen (K10/K32-WTf^{rHVS}, K10/K32-scfr-IRES^{rHVS}, K10/K32-scfrULT^{rHVS}) wurden mit fluoreszierendem Antikörper gegen **B** CD3 und in Kombination mit **C** CD4 und CD8 markiert und im Durchflusscytometer vermessen. APC: Allophycocyanin; K: T-Lymphozytenspender; PE: Phycoerythrin.

4.1.2 Funktionelle Transgenexpression über zwölf Monate

Über einen Zeitraum von zwölf Monaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 6, 9 und 12 Monate nach der Infektion (*month post infection*, mpi) die RNA- und Protein-Expression der cTCR in den transduzierten T-Lymphozyten überprüft und eine funktionelle Analyse mit Hilfe des BATDA-Cytotoxizitätstest durchgeführt.

Transkript-Analyse

Nach Isolierung der RNA mittels Trizol-Chloroform-Extraktion wurden die Transkript-Spiegel des cTCR (704 bp), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 581 bp) als zelluläre Kontrolle und von *ORF75* (virale Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase, vFGARAT; 356 bp) als virale Kontrolle untersucht [Abb. 4.5]. Alle T-Lymphozyten zeigten unabhängig vom Spender und vom transduzierten TCR-Konstrukt eine kontinuierliche Transkription des cTCR über zwölf Monate hinweg. Als Kontrolle dienten die T-Lymphozyten, die mit dem WTf^{HVS}-Virus transduziert worden waren. Aus diesen Zellen wurden keine Banden erhalten, wodurch gezeigt werden konnte, dass der Nachweis spezifisch für den cTCR ist. In

den viralen Kontrollen zeigten sich teilweise unvollständige DNase I-Verdaue, da auch in den Proben ohne reverser Transkriptase Banden detektierbar waren. Dieses liegt vermutlich daran, dass pro Zelle wesentlich mehr Kopien von ORF75 als von GAPDH vorliegen [vgl. Abschnitt 2.1].

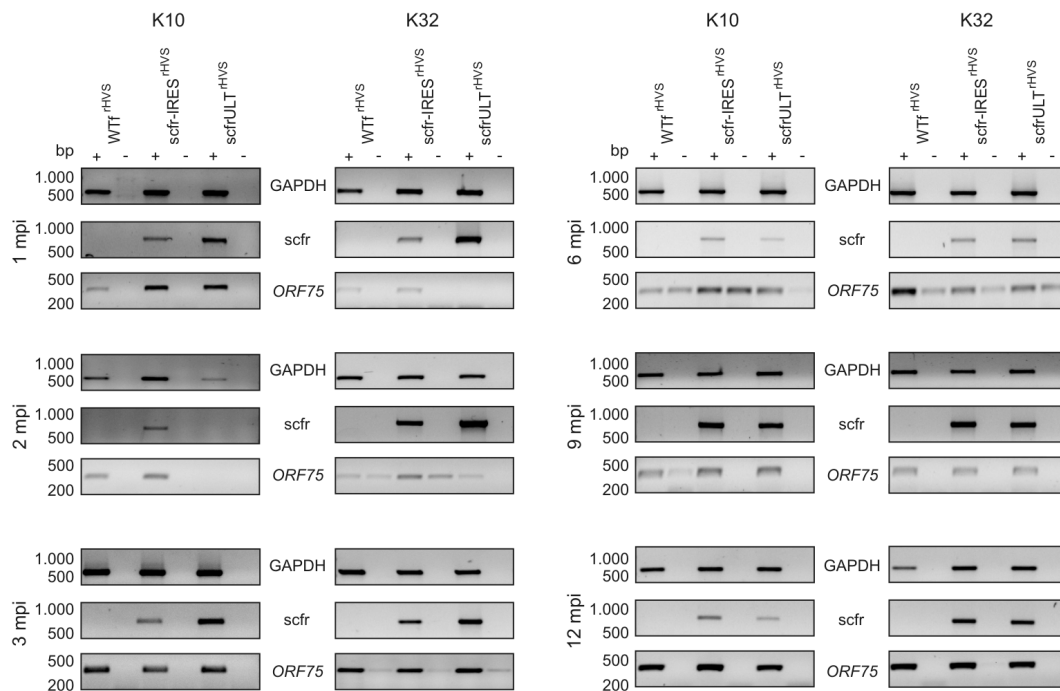


Abb. 4.5: mRNA-Analysen des chimären T-Zell-Rezeptors in den Effektor-T-Zellen während des Langzeitexperiments. Dargestellt sind die Transkript-Spiegel von *scfr*, *GAPDH* und *ORF75* aus den Kulturen (K10 und K32), transduziert mit den verschiedenen Viren (WT^{rHVS} , $scfr-IRES^{rHVS}$ und $scfrULT^{rHVS}$) zu den verschiedenen Zeitpunkten 1, 2, 3, 6, 9 und 12 mpi. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare; K: T-Lymphozytenspender; mpi: Monate nach Infektion; +: mit Zugabe von reverser Transkriptase, -: ohne Zugabe von reverser Transkriptase.

Protein-Analyse

Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass die Expression des cTCRs bei dem tricistronischen Konstrukt ($scfr-IRES^{rHVS}$) über einen Zeitraum von über zwölf Monaten nachweisbar ist. Dazu wurden Proteinlysate mit und ohne β -Mercaptoethanol hergestellt und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken zwischen den Rezeptor-Ketten zu freien Thiolen reduziert und somit gespalten [Abb. 2.3, Abb. 2.6]. Die detektierten Banden bei 130 kDa (ohne β -Mercaptoethanol) und 49 kDa (mit β -Mercaptoethanol) stellen die CD3- ζ -Kette des cTCRs dar. Die Banden bei 32 kDa (ohne β -Mercaptoethanol) und 16 kDa (mit β -Mercaptoethanol) zeigen das endogene CD3 ζ [Abb. 4.6]. Diese Banden konnten in diesem Experiment zusätzlich als Ladekontrolle angesehen werden.

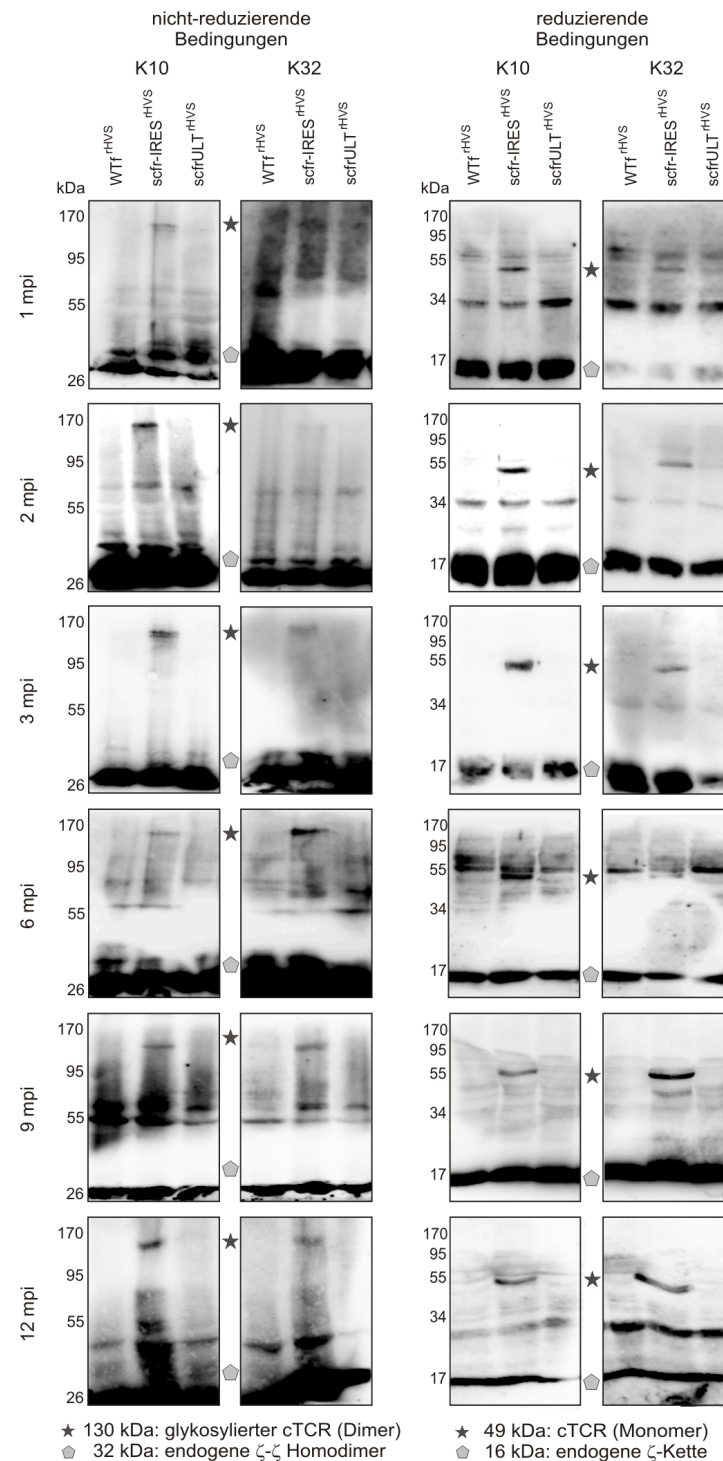


Abb. 4.6: Proteinanalysen des chimären T-Zell-Rezeptors in den Effektor-T-Zellen während des Langzeitexperiments. Dargestellt sind die Proteinmengen der endogenen und chimären ζ -Kette in unabhängigen Kulturen (K10 und K32), transduziert mit den verschiedenen Viren (WT^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS} und scfrULT^{rHVS}) zu den verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3, 6, 9 und 12 mpi). K: T-Lymphozytenspender; kDa: Kilodalton; mpi: Monate nach Infektion.

Die T-Lymphozyten mit dem separat transkribierten cTCR (scfrULT^{rHVS}) zeigten zu keinem Zeitpunkt eine detektierbare Proteinexpression. Wie bei der Analyse der mRNA-Spiegel

dienten die T-Zellen, die mit dem WTf^{rHVS}-Virus transduziert worden waren, als Kontrolle.

Immunfluoreszenz

Die folgende Immunfluoreszenz wurde mit T-Lymphozyten vom Spender K10 durchgeführt, die mit dem tricistronischen Konstrukt (scfr-IRES^{rHVS}) oder dem Wildtypvirus (WTf^{rHVS}) transduziert worden waren. Die Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert, unspezifische Bindungsstellen wurden abgesättigt und die Zellen wurden mit den Primär- und Sekundär-Antikörpern behandelt [Abb. 4.7].

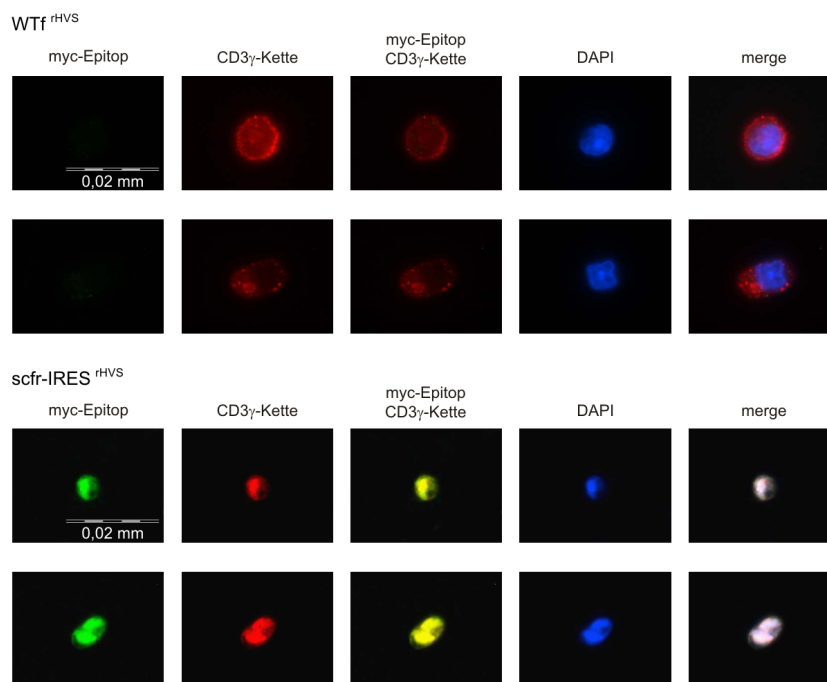


Abb. 4.7: Immunfluoreszenz zum Nachweis des chimären T-Zell-Rezeptors auf den Effektor-T-Zellen. T-Lymphozyten vom Spender K10 wurden auf Deckgläschen fixiert und mit Antikörpern gegen das myc-Epitop im cTCR und gegen die CD3 γ -Kette (chimär und endogen) inkubiert. Für den Nachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden markierte Zweitantikörper gegen die Primärantikörper verwendet. AlexaFluor[®]488 richtete sich gegen den anti-myc-Antikörper und weist somit das aus dem tricistronischen Konstrukt exprimierte Protein auf den T-Zellen nach. AlexaFluor[®]568 weist die chimäre und endogene CD3 γ -Kette nach. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt.

Als Primär-Antikörper dienten der Hybridomüberstand 9E10 dem Nachweis des myc-Epitops im cTCR und ein Antikörper gegen CD3 γ , der die endogenen CD3-Komplexe nachweist. Der Hybridomüberstand ist murinen Ursprungs und der CD3 γ -Antikörper aus dem Kaninchen. Die Sekundär-Antikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor[®]488 (myc-Epitop) bzw. AlexaFluor[®]568 (CD3 γ) gekoppelt. Der Zellkern wurde mit DAPI gegengefärbt. Die Expression des myc-Epitops und somit die Existenz des cTCR konnte eindeutig nachgewiesen werden. Durch die Übereinanderlagerung der Fluoreszenzen konnte die Kolokalisation von

CD3 γ und dem myc-Epitop des cTCRs auf der Oberfläche der Zellen gezeigt werden.

Cytotoxizität

Die Funktionalität des cTCRs gegen ErbB2 wurde im Langzeitversuch durch den BATDA-Cytotoxizitätstest nachgewiesen. Dazu wurde die ErbB2-positive Tumorzelllinie MDA-MB453 mit dem Chelator BATDA markierten und in verschiedenen Mischungsverhältnissen (1:40; 1:20; 1:10; 1:5; 1:1,25) mit den verschiedenen T-Lymphozyten (WT r^{HVS} , scfr-IRES r^{HVS} und scfrULT r^{HVS}) inkubiert. Wie es durch die Ergebnisse aus den Proteinexpressionsanalysen zu erwarten war, ergaben die Versuche mit den scfrULT r^{HVS} -transduzierten Zellen, keine spezifische Lyse. Diese Werte für die spezifische Lyse waren mit den Ergebnissen der Zellen mit dem WT r^{HVS} -Kontrollvektor vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Im Weiteren werden somit nur die Ergebnisse dargestellt, die mit dem tricistronischen Konstrukt (scfr-IRES r^{HVS}) in den T-Lymphozyten erzielt wurden. Die Ergebnisse der Zellen mit diesem Virusvektor wiesen kontinuierlich über den Zeitraum von zwölf Monaten eine spezifische Lyse der Tumorzellen auf [Abb. 4.8]. Zu Beginn der zwölf Monate wurde auch mit den WT r^{HVS} -T-Zellen eine Lyse von 97 % \pm 32 % (K32, 1 mpi) erreicht. Die Werte fielen aber ab, bis sie nach zwölf Monaten Werte von 29 % \pm 2 % erreichen (K32, 12 mpi). Nach dem zweiten Monat, wenn die Transformation der Zellen abgeschlossen und eine homogene Zellpopulation erreicht worden war, erzeugten die T-Lymphozyten mit dem scfr-IRES r^{HVS} eine spezifische Lyse zwischen 56 % (\pm 9 %) (K32, 2 mpi) und 96 % (\pm 11 %) (K10, 3 mpi).

Tab. 4.1: Zweiseitiger T-Test. Der T-Test wurde aus den Werten des BATDA-Tests errechnet. Als Grundlage dienten die 20:1 Effektor-T-Zell:Zielzell-Ergebnisse von WT r^{HVS} und scfr-IRES r^{HVS} .

Spender	Zeitpunkt	p-Wert	Spender	Zeitpunkt	p-Wert
K10	1 mpi	0,1200	K32	1 mpi	0,3293
	2 mpi	0,0008		2 mpi	0,0075
	3 mpi	0,0120		3 mpi	0,0502
	6 mpi	0,0517		6 mpi	0,0007
	9 mpi	0,0166		9 mpi	0,0010
	12 mpi	0,0022		12 mpi	0,0000

Die Daten wurden zusätzlich über einen zweiseitigen T-Test ausgewertet, der belegt, dass die statistische Signifikanz der gewonnenen Werte von WT r^{HVS} und scfr-IRES r^{HVS} über den Zeitraum zunimmt und der Hintergrund der mit WT r^{HVS} -transduzierten Zellen somit immer weiter abnahm [Tab. 4.1].

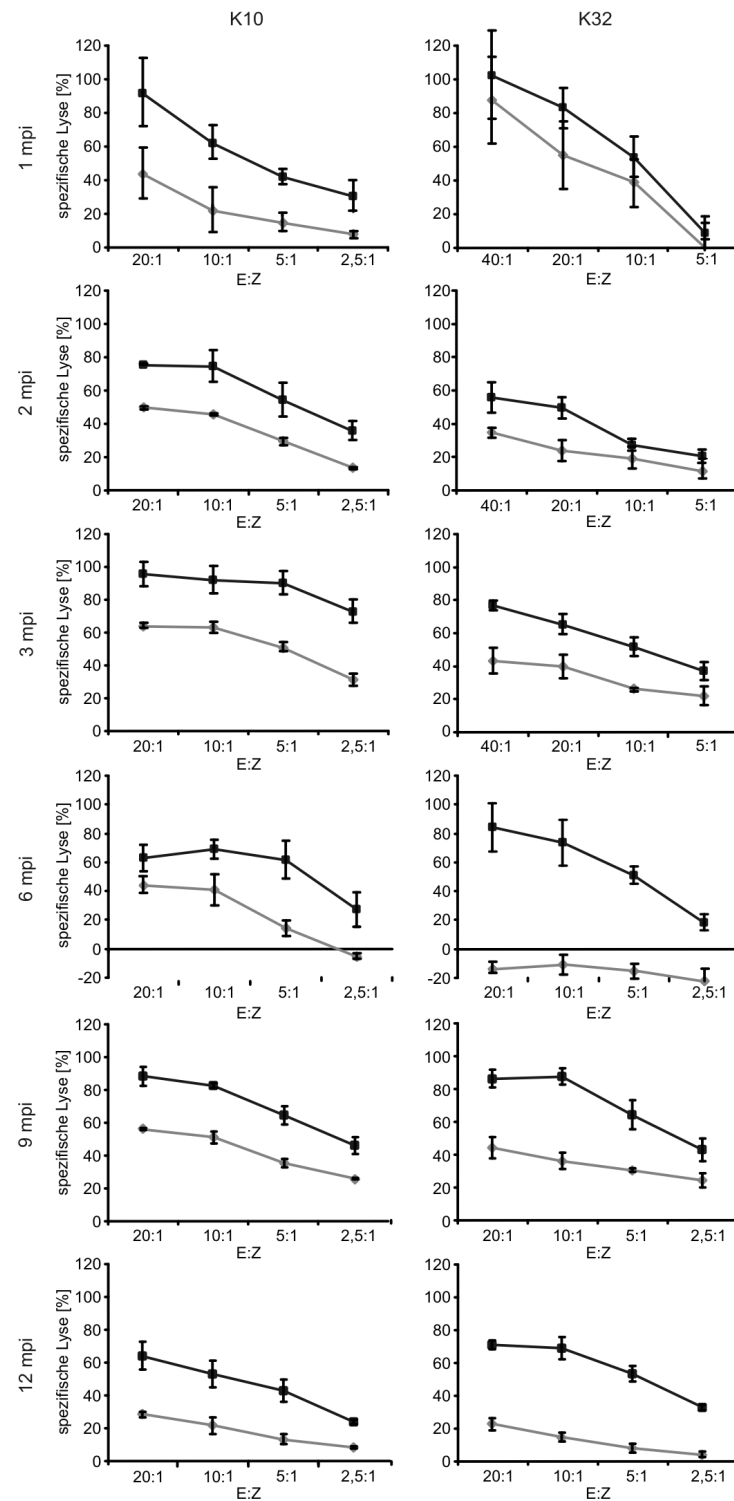


Abb. 4.8: Cytotoxizitätstest mit dem BATDA-Reagenz im Langzeitversuch über zwölf Monate. Dargestellt sind die Ergebnisse zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 6, 9 und 12 Monate nach der Infektion (mpi) der T-Lymphozyten. Die Tumorzelllinie MDA-MB453 wurde mit BATDA markiert, für 2 h mit Effektor-T-Zellen inkubiert und das austretende TDA durch Europiumionen nachgewiesen. E: Effektor-T-Zellen; K: T-Lymphozytenspender; Z: Zielzellen; schwarze Werte: scfr-IRES^{rHVS}; hellgraue Werte: WT^{rHVS}.

Die Inhibition der spezifischen Lyse durch das Antibiotikum Concanamycin A (CMA) blockiert den Perforin-abhängigen Weg der Zelllyse. CMA wurde vor der Zugabe der Zielzellen zu den Effektorzellen gegeben. Die Ergebnisse zeigen eine effektive Hemmung nach Zugabe von CMA von mindestens 53 % (K32, 2 mpi) [Abb. 4.9].

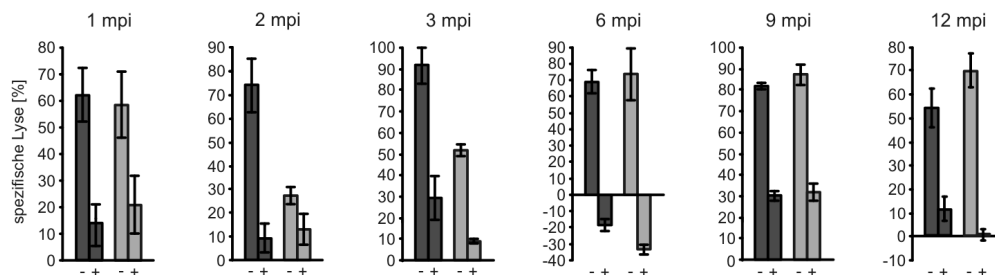


Abb. 4.9: Inhibition der Cytotoxizität durch Concanamycin A. Dargestellt sind die prozentualen Werte der spezifischen Lyse der 10:1 Effektor:Zielzell-Ergebnisse ohne (-) und mit (+) Zugabe von Concanamycin A über einen Zeitraum von zwölf Monaten. mpi: Monate nach Infektion.

Der Versuch, die spezifische Lyse durch den humanen monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) zu blockieren, gelang nicht (Daten nicht gezeigt). Trastuzumab wird als Arzneistoff erfolgreich in der Therapie gegen Mammakarzinome eingesetzt. Der Antikörper bindet an den ErbB2-Rezeptor und hemmt dadurch das Wachstum der Tumorzellen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der cTCR und Trastuzumab gegen verschiedene Bereiche des ErbB2-Rezeptors wirken.

4.1.3 Zielzellspektrum für die Lyse durch den cTCR

Nach Abschluss der Langzeitexperimente wurden weitere Tumorzellen daraufhin untersucht, ob diese sich auch durch cTCR-transduzierte T-Lymphozyten lysieren lassen. Dazu wurde zunächst die Literatur nach bekannten ErbB2-positive Tumorzellen durchsucht. Zusätzlich wurden primäre Tumorzellkulturen (ZG) und Subpopulationen primärer Tumorzellen (KL) aus der Frauenklinik in Kiel zur Verfügung gestellt. Die Subpopulationen sind adhärent und entstanden während der Primärkultur von Aszites bei Ovarialkarzinom. Diese Kulturen veränderten sich nach einiger Zeit, so dass eine adhärente und eine Suspensionspopulation entstanden. Zusätzlich wurden unveränderte murine Zellen (NIH3T3, Renca) und murine Zellen kultiviert, die stabil mit einem ErbB2-tragendem Konstrukt transfiziert worden waren (NIH3T3-ErbB2). Die verschiedenen Zellen wurden auf ihre humane ErbB2-Rezeptor-Expression im Durchflusscytometer untersucht [Abb. 4.10].

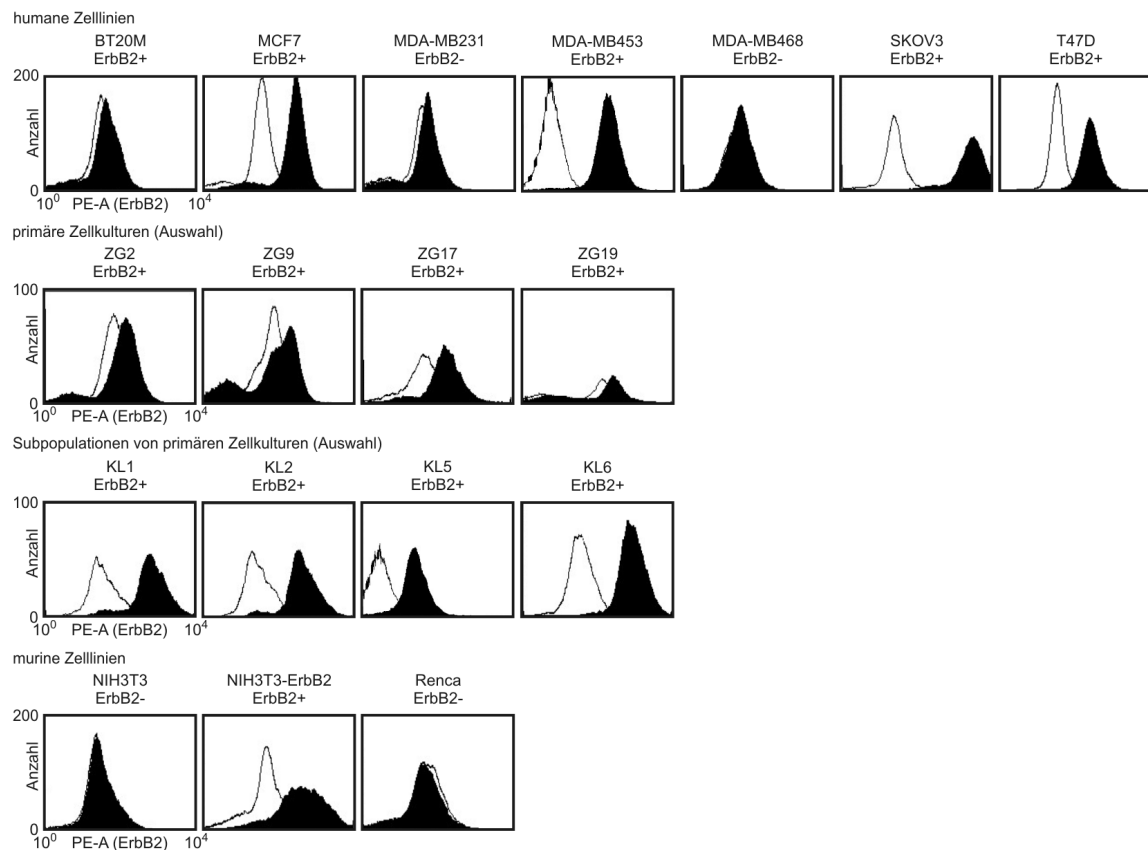


Abb. 4.10: Analyse der ErbB2-Expression weiterer Tumorzellen. Verschiedene humane Zelllinien, primäre humane Zellkulturen, Subpopulationen von humanen Zelllinien und transfizierte murine Zelllinien wurden auf ihre ErbB2-Expression im Durchflusscytometer untersucht. PE: Phycoerythrin

Dabei stellte sich wie erwartet heraus, dass nur die Tumorzelllinie MDA-MB468 und die nicht transfizierten murinen Zellen kein ErbB2-Rezeptor exprimierten. MDA-MB468 wurde in den weiteren Versuchen als Negativkontrolle verwendet. Die getesteten Zellen wurden in einem zweiten Schritt auf ihre Fähigkeit hin untersucht, sich durch den Chelator BATDA markieren zu lassen [Abb. 4.11]. Diese Eigenschaft ist entscheidend, damit die spezifische Lyse der Tumorzellen im BATDA-Cytotoxizitätstest mit T-Lymphozyten von zwei verschiedenen Spendern (K10, K32) mit und ohne cTCR (WTf^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) bestimmt werden kann. Nach chemischer Zellyse zeigten die Ergebnisse, dass diese Zellen den Chelator unterschiedlich gut über ihre Zellmembran aufnehmen können. Jede Zelllinie konnte aber ausreichend für den Cytotoxizitätstest markiert werden.

Zur Verdeutlichung der unterschiedliche Stärke der ErbB2-Expression der einzelnen Tumorzellen wurde eine Auswahl an Proteinlysaten im Westernblot untersucht [Abb. 4.12]. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Tumorzelllinie MDA-MB468 keine ErbB2-Expression aufwies, wohingegen die Zelllinie SKOV3 aus dem Aszites eines Ovarialtumors die stärkste ErbB2-Expression

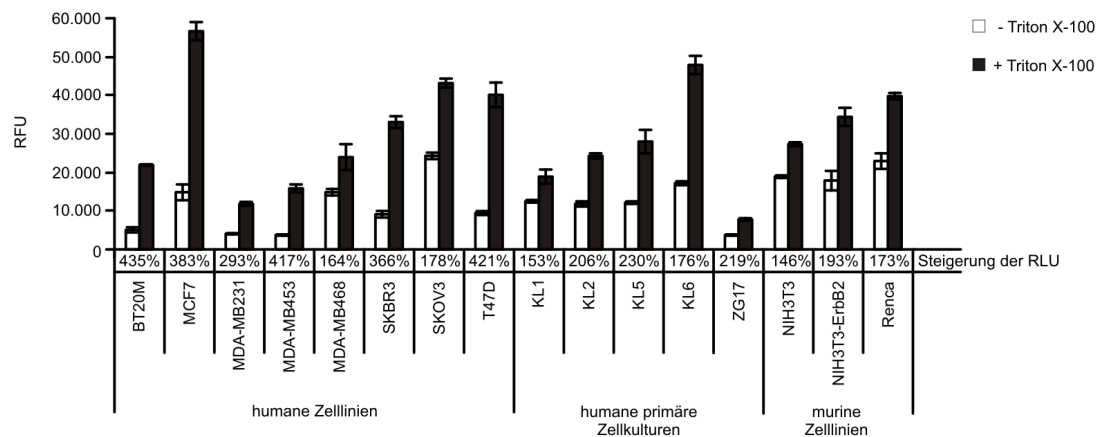


Abb. 4.11: Analyse der BATDA-Aufnahme der Tumorzellen. Die verschiedenen Tumorzellen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, sich durch den Chelator BATDA markieren zu lassen und dieses nach einer chemischen Zelllyse wieder freizusetzen. KL: Subpopulationen von primären Zellkulturen; RFU: relative Fluoreszenzeinheit; ZG: primäre Zellkultur.

zeigte. Bei der untersuchten primären Tumorzellkultur ZG17 zeigte sich eine sehr schwache Bande, die erst nach verlängerter Belichtungszeit sichtbar wurde. Die übrigen verwendeten Tumorzellen (MDA-MB453, T47D, KL1, KL2, KL5, KL6) zeigten eine mittlere Expressionsstärke. Die Ergebnisse der Proteinanalyse unterstützen somit jene im Durchflusscytometer gewonnenen Werte [Abb. 4.10].

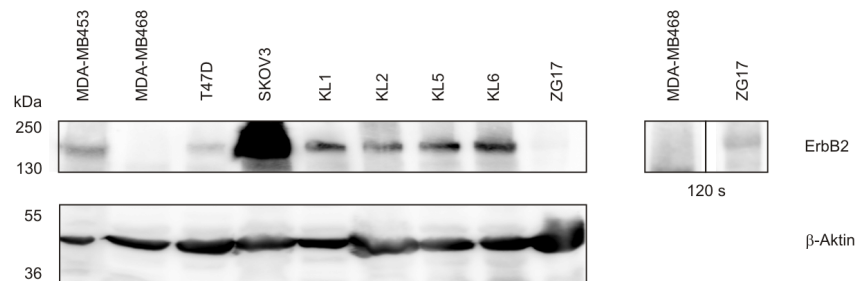


Abb. 4.12: Proteinanalyse der Tumorzellen. Die Analyse der ErbB2-Expression erfolgte im Westernblot. Da die Expression auf der primären Tumorzellkultur ZG17 sehr gering ist, wurde die Belichtungszeit um das 4-fache verlängert (120 s). kDa: Kilodalton; KL: Subpopulationen von primären Zellkulturen; ZG: primäre Zellkulturen.

Im Anschluss an den Westernblot wurde der BATDA-Cytotoxizitätstest durchgeführt. Die unterschiedlichen Tumorzellen (Zelllinien, primäre Zellkulturen, Subpopulationen von primären Zellkulturen) konnten durch die zugegebenen T-Lymphozyten mit cTCR spezifisch lysiert werden. Zwischen den Tumorzelllinien und den primären Tumorzellen war kein Unterschied erkennbar [Abb. 4.13]. Die ErbB2-negative Zelllinie MDA-MB468 zeigte bei Zugabe der T-Lymphozyten mit dem cTCR oder den WT^{rHVS}-T-Zellen eine ähnlich starke Hintergrund-

Lyse (K10: 12 % zu 28 %; K32: 33 % zu 35 %). Außerdem waren die prozentualen Werte der spezifischen Lyse mit den scfr-IRES^{rHVS}-T-Zellen hier niedriger als mit den WT^{rHVS}-Zellen. Daraus folgt, dass sich viele unterschiedliche Tumorzell-Typen aufgrund des auf ihrer Zelloberfläche exprimierten ErbB2-Moleküls durch die transduzierten T-Zellen spezifisch abtöten lassen. Die murinen Zelllinien, ob unverändert oder stabil transfiziert, zeigten nach mehrmaligen Versuchen ein uneinheitliches Bild (Daten nicht gezeigt), weshalb sie in den folgenden Versuchen keine Verwendung erfuhren.

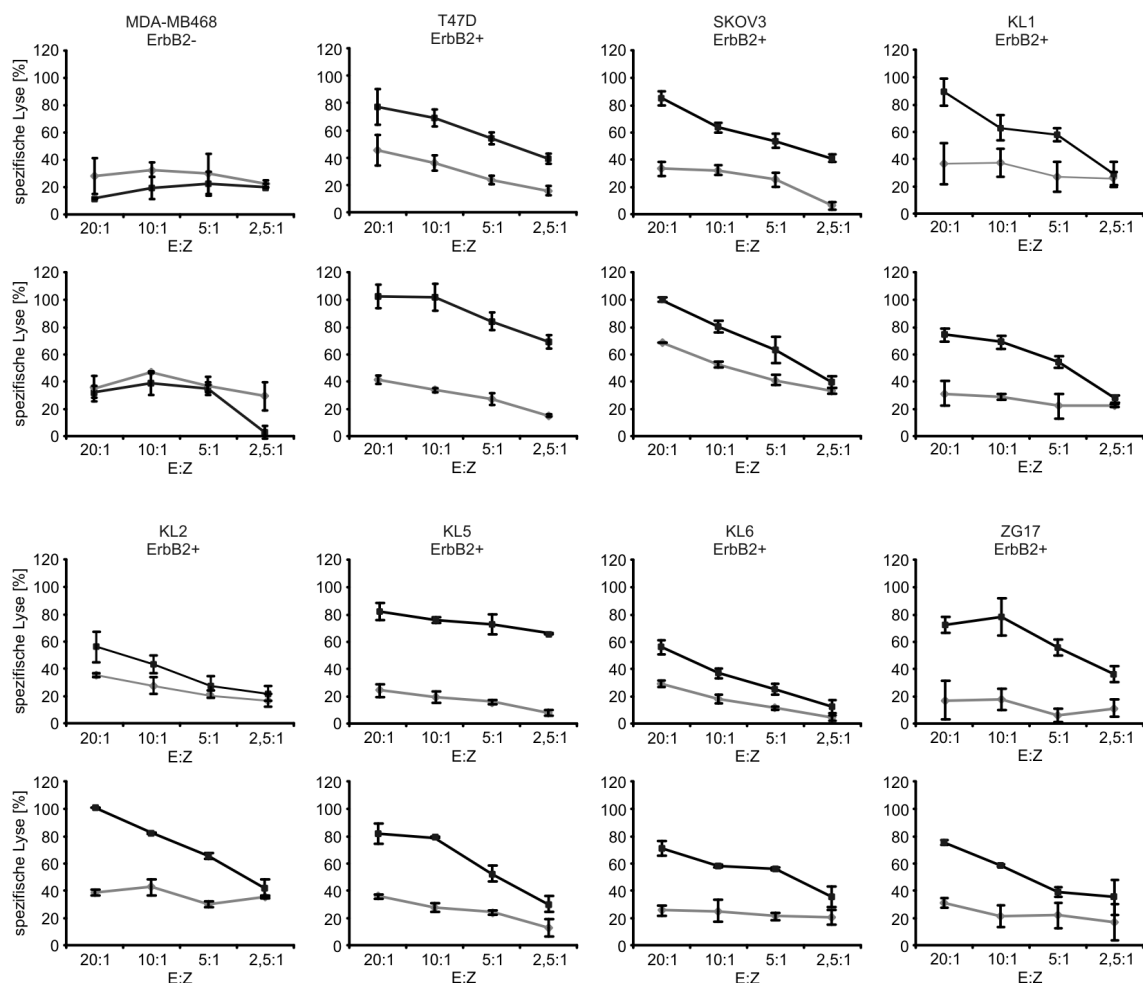


Abb. 4.13: Cytotoxizitätstest der unterschiedlichen Tumorzellen mit dem BATDA-Reagenz. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei humanen Tumorzelllinien, vier Subpopulationen primärer Zellkulturen (KL) und einer primären Zellkultur (ZG) im BATDA-Cytotoxizitätstest. Als Effektor-T-Zellen (WT^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) dienen die transduzierten T-Lymphozyten von zwei Spendern (K10, K32). E: Effektor-T-Zellen; KL: Subpopulationen von primären Zellkulturen; Z: Zielzellen; ZG: primäre Zellkultur; oberer Graph: K10; unterer Graph: K32; schwarze Werte: scfr-IRES^{rHVS}; hellgraue Werte: WT^{rHVS}.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem BATDA-Test wurden die Effektor- und Zielzellen in weiteren Cytotoxizitätstests verwendet. Der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Test bestimmt die

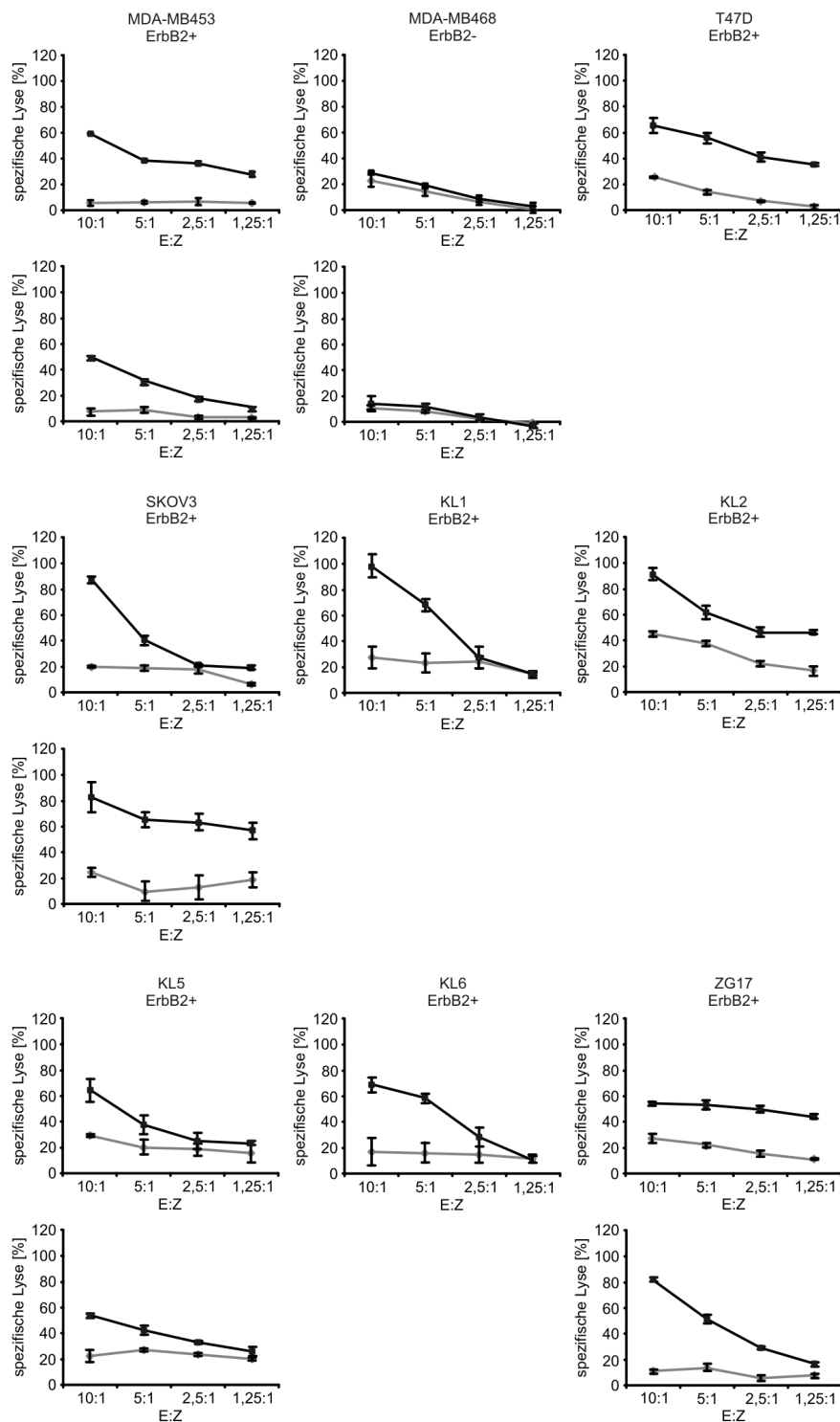


Abb. 4.14: Laktatdehydrogenase-Test. Die Tumorzellen wurden für 6 h mit definierter Menge an transduzierten T-Lymphozyten (WT^{rhVS}, scf-IRES^{rhVS}) von zwei verschiedenen Spendern (K10, K32) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die ausgetretene Menge an LDH nachgewiesen. E: Effektor-T-Zellen; Z: Zielzellen; oberer Graph: K10; unterer Graph: K32; schwarze Werte: scf-IRES^{rhVS}; hellgraue Werte: WT^{rhVS}.

Aktivität der cytoplasmatischen LDH, die aus den lysierten Zellen austritt. Auch hier wurden unterschiedliche Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen gewählt, so dass ein möglichst aus-

sagekräftiges Ergebnisse erreicht werden konnte (10:1; 5:1; 2,5:1; 1,25:1). Damit vergleichbare Ergebnisse erhalten werden konnten, wurden Effektorzellen aus denselben Spendern K10 und K32 wie für den BATDA-Cytotoxizitätstest verwendet. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Versuche schon seit über zwölf Monaten in dem transformierten Zustand. Auch im LDH-Test zeigte sich eindeutig eine spezifische Lyse der Tumorzellen [Abb. 4.14].

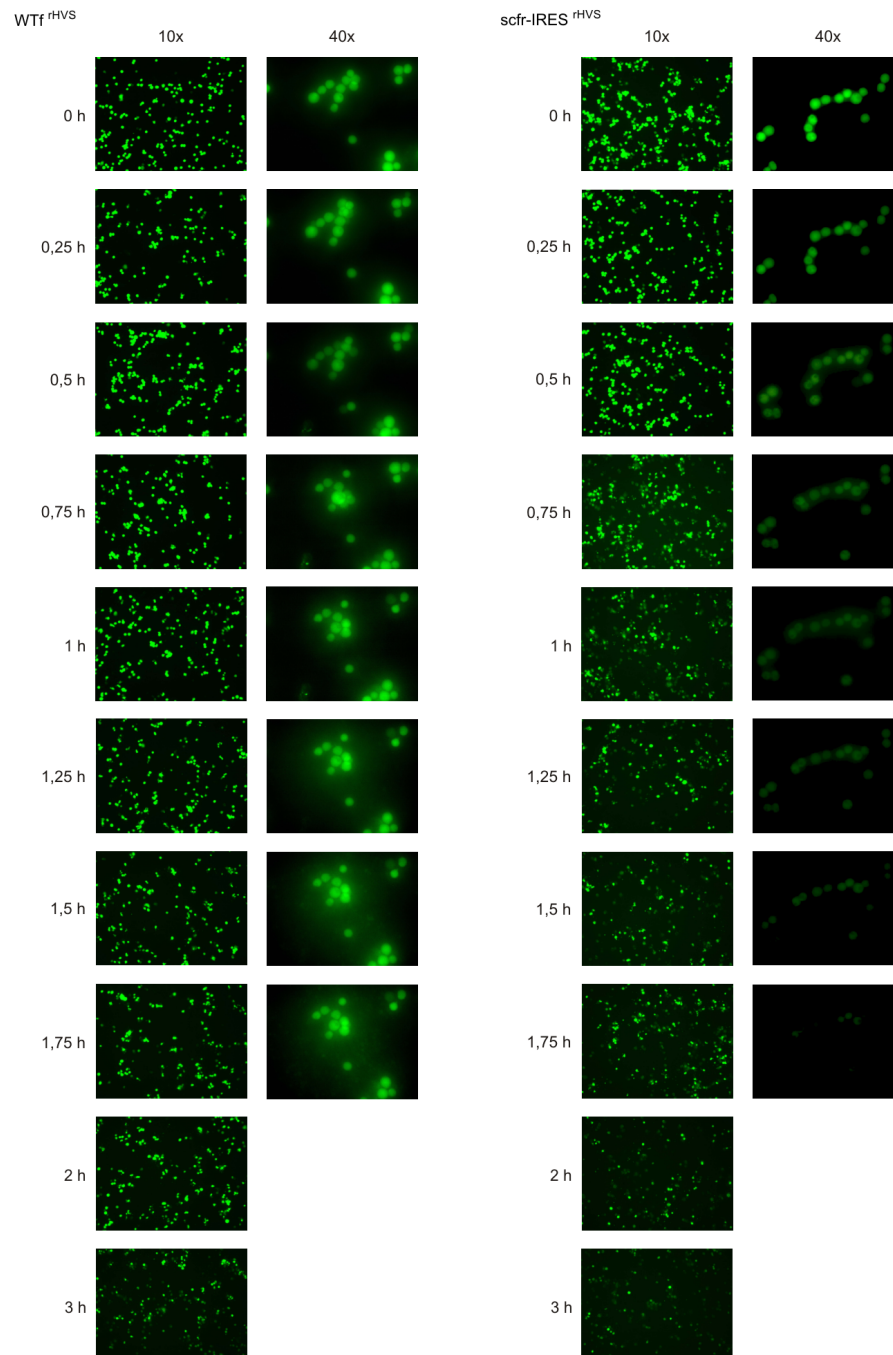


Abb. 4.15: Calcein-Test. Die Tumorzelllinie MDA-MB453 wurde mit dem Acetoxymethylester von Calcein markiert, mit Effektor-T-Zellen (WTf^{rhVS}, scfr-IRES^{rhVS}) in einem Verhältnis von 20:1 für 3 h im Inkubator des *Live-cell-imaging*-Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzabnahme in 10x- und 40x-Vergrößerung.

Je größer die Anzahl der T-Lymphozyten wurde, desto mehr LDH konnte im Überstand nachgewiesen werden. Die ErbB2-negative Tumorzelllinie MDA-MB468 zeigte dagegen keine erhöhte Freisetzung von LDH nach Zugabe der T-Zellen mit cTCR.

Zur Visualisierung der spezifischen Cytotoxizität unter dem Mikroskop wurde der Acetoxymethylester (AM) von Calcein verwendet. In der Zellbiologie dient Calcein-AM auch zur Kontrolle der Zellviabilität. Hier wurde die Tumorzelllinie MDA-MB453 mit Calcein-AM markiert und für 3 h in einem *Live-cell-imaging*-Ansatz in Anwesenheit der T-Lymphozyten inkubiert (E:Z = 20:1). Die Abnahme der Fluoreszenz durch Tumorzelllyse war deutlich zu sehen [Abb. 4.15]. In der 40x-fachen Vergrößerung waren die Tumorzellen, die mit den scfr-IRES^{rHVS}-T-Zellen inkubiert wurden, nach 1,75 h kaum noch zu erkennen. In der 10x-fachen Vergrößerung waren nach 3 h nur noch vereinzelt grün leuchtende Zellen zu sehen. Die Fluoreszenzstärke nahm in der Vergleichsprobe mit den WTf^{rHVS}-T-Lymphozyten deutlich schwächer ab, was die Spezifität des Tests unterstreicht.

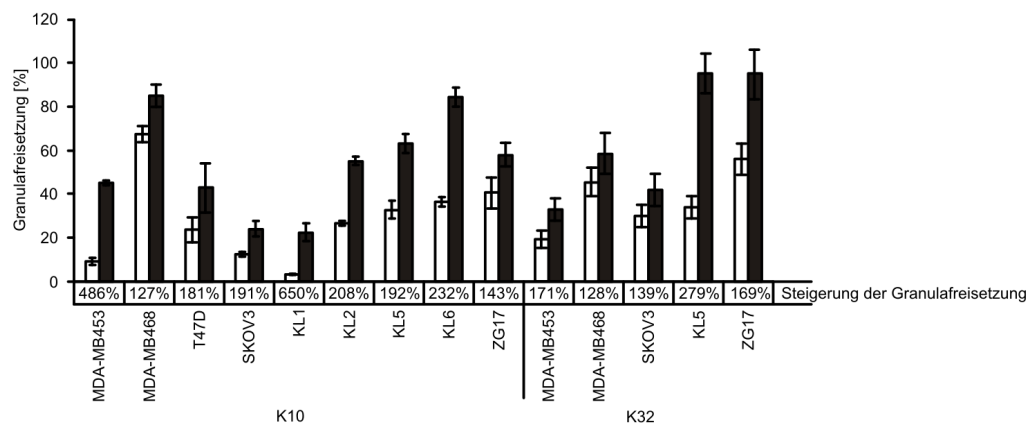


Abb. 4.16: Test zur Bestimmung der Granulafreisetzung. Die verschiedenen Tumorzellen wurden mit T-Lymphozyten (WTf^{rHVS}, scfr-IRES^{rHVS}) von zwei verschiedenen Spendern (K10, K32) für 3 h inkubiert. Das austretende Granzym B wurde über eine gekoppelte enzymatische Reaktion nachgewiesen. K: T-Lymphozytenspender; KL: Subpopulationen von primären Zellkulturen; ZG: primäre Zellkultur; weiße Balken: T-Lymphozyten mit WTf^{rHVS}; schwarze Balken: T-Lymphozyten mit scfr-IRES^{rHVS}.

Mit der Bestimmung der Granulafreisetzung der T-Lymphozyten wurde die Freisetzung des Granzym B aus den cTCR-tragenden T-Zellen nach Kontakt mit dem ErbB2 der Tumorzellen untersucht. Dazu wurde ein Thiobenzylester zugegeben, der durch das aus den Granula der T-Zellen durch Exocytose freigesetzte Granzym B umgesetzt wird. Die entstehenden Thiolgruppen können quantitativ durch das Ellman-Reagenz nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Granula-Freisetzung bei den cTCR-exprimierenden T-Lymphozyten im Vergleich zu den WTf^{rHVS}-T-Zellen erhöht war. Bei KL1 nahm die Granulafreisetzung bis auf das

6,5-fache des Hintergrundwertes zu [Abb. 4.16].

Somit konnte durch mehrere unabhängige Testsysteme eindeutig gezeigt werden, dass mit cTCR-exprimierenden T-Lymphozyten eine spezifische Lyse von ErbB2-positiven Tumorzellen konstant über lange Zeiträume erreicht werden kann.

4.1.4 Vergleich von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in der spezifischen Tumorzelllyse

Die vorangegangenen Versuche zeigten konsistent eine leichte Hintergrundlyse bei Verwendung der WTf^{rHVS}-transduzierten T-Lymphozyten. Daher sollte versucht werden, diese Lyse durch die Generierung transduzierter CD4⁺-T-Zellen zu minimieren. Dazu wurden T-Lymphozyten erneut mit WTf^{rHVS} und scfr-IRES^{rHVS} transduziert.

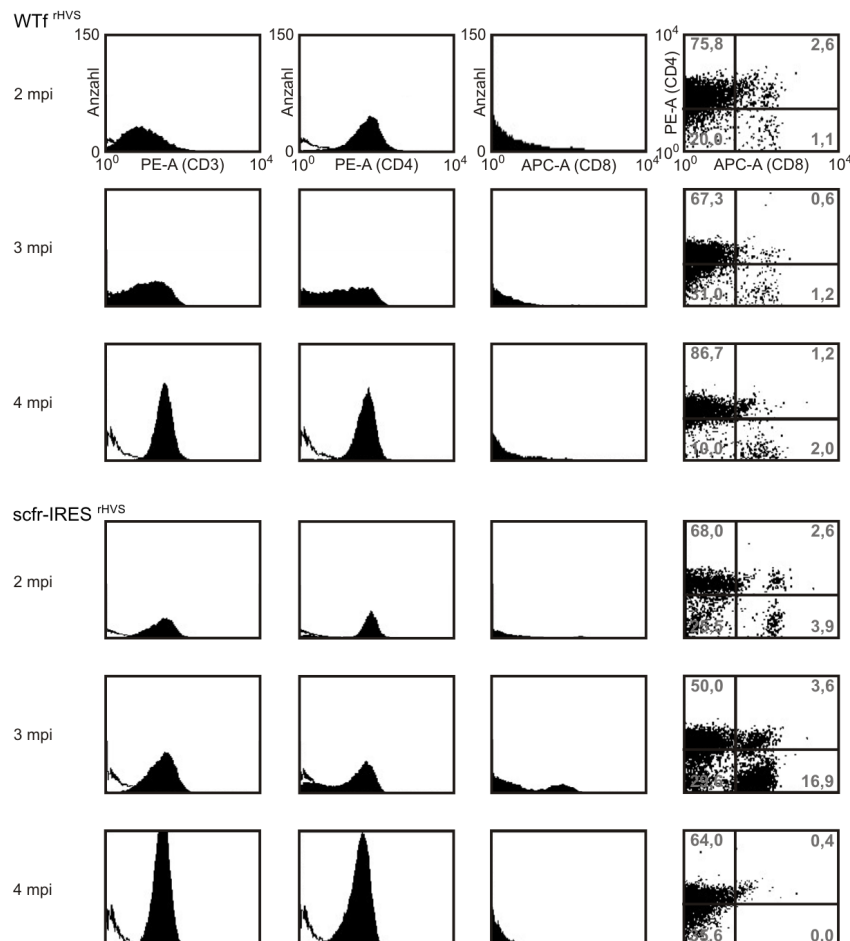


Abb. 4.17: Überprüfung der magnetischen Sortierung der T-Lymphozyten. Dargestellt ist die Analyse der T-Lymphozyten im Durchflusscytometer. Die Zellen wurden 2, 3 und 4 Monate nach der Transduktion (mpi) mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 markiert und vermessen. Die magnetische Sortierung erfolgte 1 und 3 mpi. APC: Allophycocyanin; PE: Phycoerythrin.

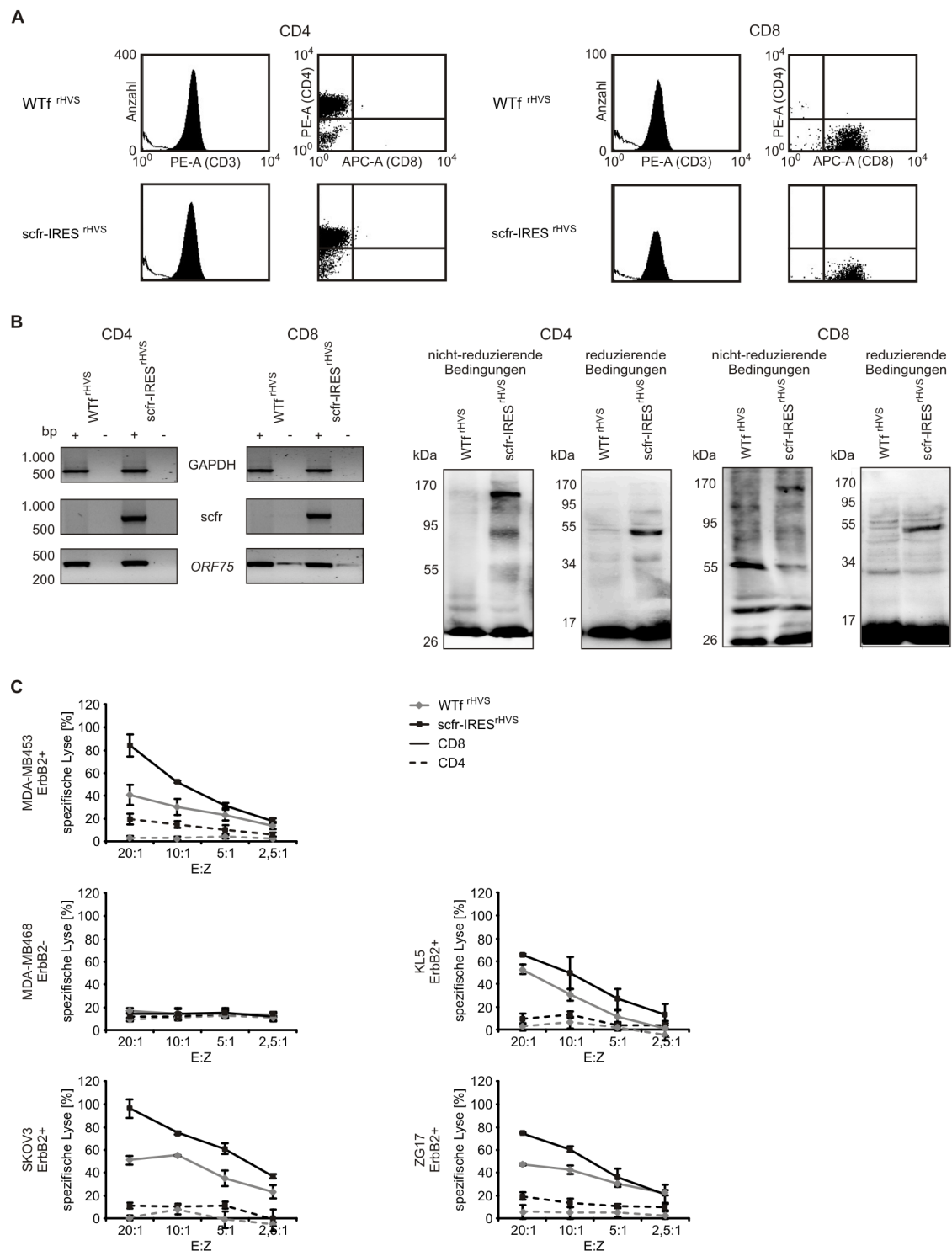


Abb. 4.18: Vergleich von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten. **A** Durchflusscytometrie der beiden T-Lymphozytenpopulationen auf ihre CD3-, CD4- und CD8-Oberflächenexpression. **B** RNA- und Proteinanalyse der T-Zell-Populationen. Die cDNA wurde auf scfr, GAPDH und *ORF75* hin untersucht. Im Westernblot wurde die CD3 ζ -Kette nachgewiesen. **C** BATDA-Cytotoxizitätstest mit den Tumorzelllinien MDA-MB453, MDA-MB468, SKOV3, KL5 und ZG17. APC: Allophycocyanin; E: Effektor-T-Zellen; kDa: Kilodalton; PE: Phycoerythrin; Z: Zielzellen; +: mit Zugabe von reverser Transkriptase; -: ohne Zugabe von reverser Transkriptase.

Da $CD4^+$ -T-Zellen einen vergleichsweise geringen IL-2-Bedarf haben, wurden diese Zellen in Medium mit 1/10 der Menge an IL-2 (5 U/ml) kultiviert und ein und drei Monate nach der Transduktion unter Verwendung an Magnetpartikel gekoppelter Antikörper sortiert. Die verwendeten Biotin-markierten Antikörper richteten sich gegen die spezifischen Oberflächenmoleküle CD8 (cytotoxische T-Lymphozyten), CD14 (Monozyten und Makrophagen), CD16 (Phagozyten), CD19 (B-Lymphozyten), CD36 (Monozyten), CD123 (pluripotente Vorläuferzellen), $TCR\gamma/\delta$ (T-Lymphozyten) und Glycophorin A (humane Erythrozyten). Sowohl die reine Population an $CD4^+$ - als auch die abgetrennte Population an $CD8^+$ -T-Zellen wurde anschließend weiter kultiviert. Nach zwei, drei und vier Monaten wurde die Effizienz der Sortierung im Durchflusscytometer überprüft [Abb. 4.17]. Bei der letzten Messung nach vier Monaten zeigte sich eine homogene $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -T-Zell-Population.

Die T-Lymphozyten-Populationen wurden ebenfalls einer RNA- und Proteinanalyse unterzogen. Nachdem sowohl die mRNA des cTCRs als auch die Proteinexpression bestätigt werden konnten, wurden fünf Tumorzelllinien (MDA-MB453, MDA-MB468, SKOV3, KL5 und ZG17) ausgewählt und im BATDA-Cytotoxizitätstest miteinander verglichen [Abb. 4.18]. Die Population der $CD8^+$ -T-Lymphozyten zeigte erneut die in Abb. 4.8 und Abb. 4.13 bereits dargestellten Ergebnisse, die $CD4^+$ -T-Zellen zeigten dagegen nur eine verminderte Hintergrundlyse, bei gleichzeitig drastisch verringerter Induktion der spezifischen Lyse. Entsprechend sind cTCR-transduzierte $CD4^+$ -T-Zellen für die spezifische Lyse von Tumorzellen offenbar nicht geeignet.

4.2 Tumorspezifische Transgenexpression durch regulatorische Elemente des Alpha-Fetoproteins

Das Ziel dieses Projektes war die Etablierung eines viralen Vektors, der durch die Wahl des Promotors nur eine Zell-spezifische Fremdgenexpression ermöglicht. Als Basis für die gewebespezifische Transgenexpression diente die regulatorische Kasette des Alpha-Fetoprotein-Gens (AFP), die in den Leberzellen eines Erwachsenen die Expression des AFP nur dann ermöglicht, wenn diese in eine Tumorzelle transformiert ist [Tatarinov, 1964].

Als Ausgangskonstrukt dienten verschiedene BACs mit Tet-regulierten Transgenen (eGFP, tBid und reverse Caspase 3) in *ORF75* und mit einer Deletion der Onkogene für StpC und Tip ($\Delta ORF1$) [Toptan, 2010b].

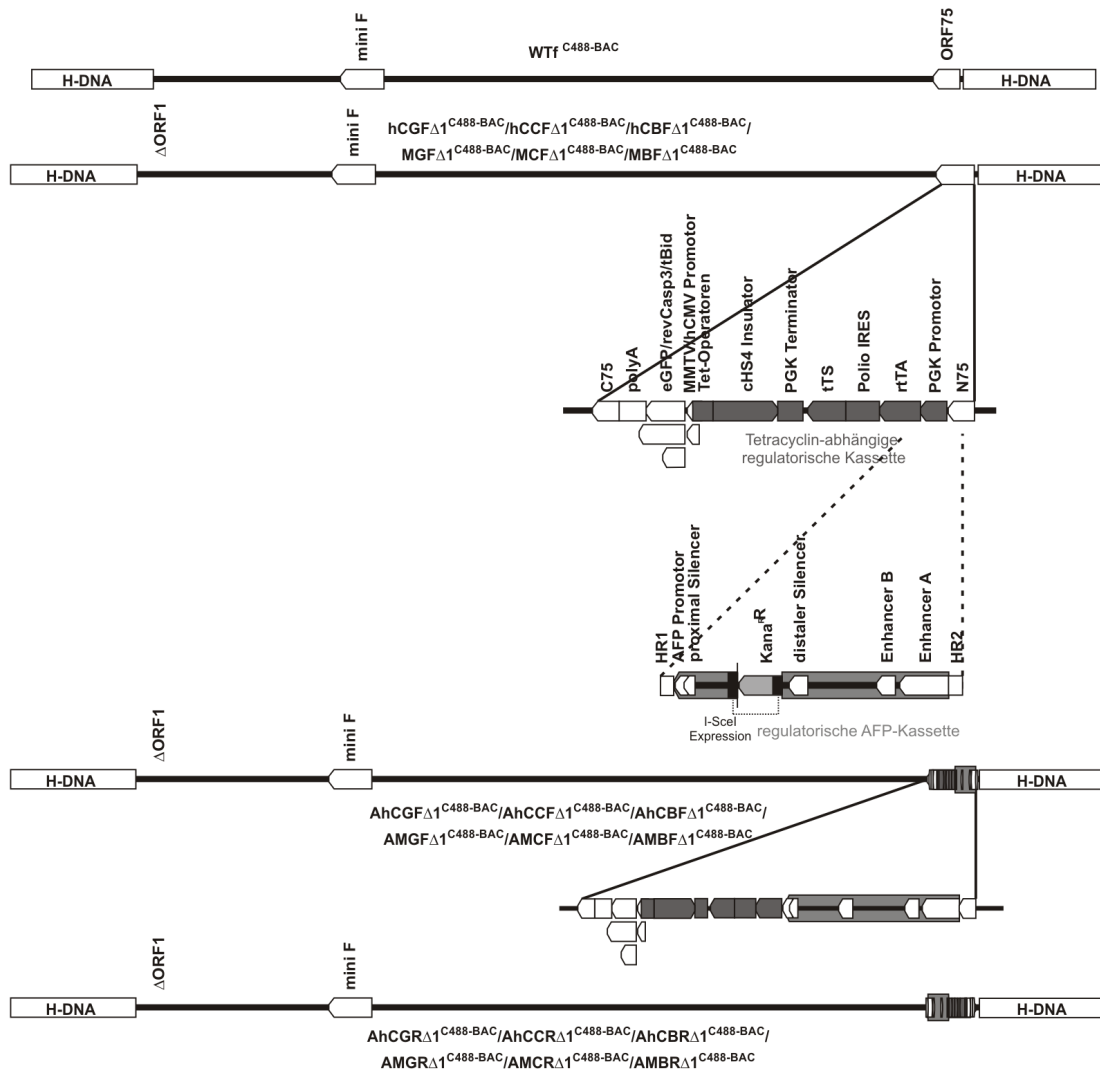


Abb. 4.19: Rekombinante WTf^{C488-BAC} mit regulatorischer Kasette des Alpha-Fetoprotein-Gens in einem Tet-regulierten Konstrukt. Dargestellt ist die Insertion der regulatorischen Kasette des AFP-Gens anstelle des PGK-Promotors in die schon vorhandene Tet-regulatorische Einheit (*ORF75*) verschiedener HVS-BACs, die eine *ORF1*-Deletion ($\Delta ORF1$) aufweisen. BACs: WTf^{C488-BAC}: Wildtyp-BAC mit mini-F-Fragment; hCGF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/hCCF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/hCBF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}: BAC nur mit dem hCMV-Promotor in direkter Orientierung mit eGFP/reverse Caspase3/ tBid als Transgen; MGF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/MCF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/MBF $\Delta 1$ ^{C488-BAC}: BAC mit dem MMTV-Promotor in direkter Orientierung mit eGFP/reverse Caspase3/tBid als Transgen; AhCG(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/AhCC(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/AhCB(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}: BAC mit der AFP-Kasette und dem hCMV-Promotor in direkter/reverser Orientierung mit eGFP/reverse Caspase3/tBid als Transgen; AMG(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/AMC(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}/AMB(F/R) $\Delta 1$ ^{C488-BAC}: BAC mit der AFP-Kasette und dem MMTV-Promotor in direkter/reverser Orientierung mit eGFP/reverse Caspase3/tBid als Transgen; C75: C-Terminus von *ORF75*; chS4 Insulator: Hühner- β -Globin-Isolator; eGFP/G: verstärktes grün fluoreszierendes Protein; hCMV Promotor/hC: humaner Cytomegalovirus-Promotor; HR1: Homologe Region 1; HR2: Homologe Region 2; Kana^R: Kanamycin-Resistenzkasette; MMTV Promotor/M: Maus-Mammatumovirus-Promotor; N75: N-Terminus von *ORF75*; ORF: offener Leserahmen; PGK Promotor: Phosphoglyceratkinase-Promotor; PGK Terminator: Phosphoglyceratkinase-Terminator; Polio IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle des Poliovirus; polyA: polyA-Sequenz; rtTA: reverser Tet-abhängiger Transaktivator; Tet-Operator: Tetracyclin-Operator; revCasp3/C: reverse Caspase 3; tBid/B: verkürztes Bid; tTS: Tet-abhängiger Transsilencer.

Die BACs mit eGFP als fluoreszierendem Transgen wurden soweit verändert, dass die regulatorische Kasse des AFP-Promotors inklusive Silencer und Enhancer vor die Expressionskassette für die Tet-Schalter-Proteine rekombiniert wurde. Diese Arbeiten wurden in der von mir experimentell betreuten Diplomarbeit von Björn Brändl beschrieben. Die Rekonstitution der Viren wurde für die vorliegenden Ergebnisse erneut durchgeführt, da während der Diplomarbeit nur unzureichende Titer erzielt werden konnten. Die BACs mit den apoptotischen Genen für tBid und reverse Caspase 3 wurden für diese Arbeit rekombiniert und zu Viren rekonstituiert.

4.2.1 Virusvektoren mit der regulatorischen Kasse des AFP-Gens

Nach Klonierung der regulatorischen Kasse des AFP-Gens mit einer Kanamycin-Resistenz in einen Transfektor wurde die Kasse nach einem I-CeuI-Verdau mittels *En passant*-Mutagenese in die vorhandenen BACs eingefügt [Abb. 4.19].

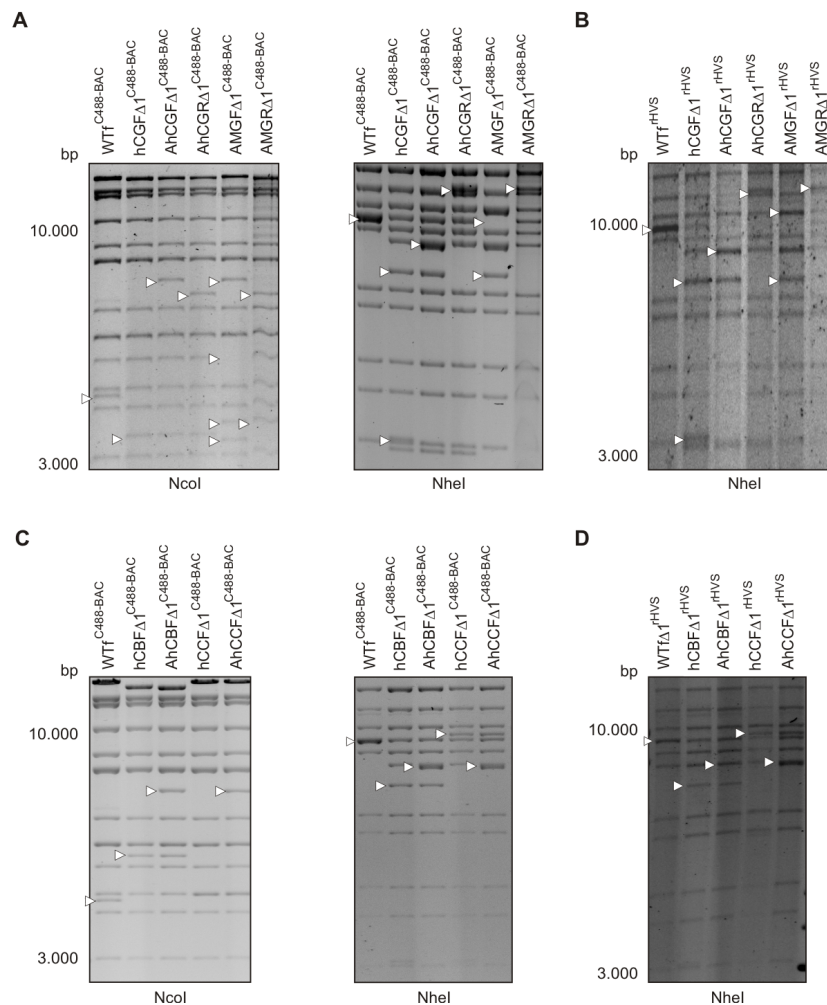


Abb. 4.20: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse von BAC- und Virus-DNA. Die Pfeilspitzen deuten auf die Unterschiede in den Bandenmustern. **A** und **C** Verdau der BAC-DNA mit NcoI und NheI. **B** und **D** Verdau der Virus-DNA mit NheI. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare.

Nach der zweiten Rekombination, durch die der positive Kanamycin-Marker restlos entfernt wurde, wurden die fertig gestellten BACs mittels RFLP-Analyse überprüft. Nach Auftrennung im Agarosegel zeigten sich die erwarteten Unterschiede im Bandenmuster [Abb. 4.20A, C]. Nach der Virusrekonstitution in permissiven OMK-Zellen wurde die virale DNA aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Nach der Rekonstitution ergaben sich die gleichen Bandenmuster wie beim vorherigen BAC-Verdau [Abb. 4.20B, D].

Von den rekonstituierten Virusvektoren wurden Replikationskinetiken aufgenommen [Abb. 4.21]. Dabei ergaben sich für alle neu erstellten Vektoren Replikationskurven, die mit denjenigen des Wildtypvirus WT^{HVS} und des Wildtypvirus mit mini-F-Fragment WT^{F}^{HVS} vergleichbar waren. Daraus lässt sich schließen, dass die Transgen-Insertion mit einem Gesamtumfang von fast 11.000 bp bei zusätzlicher Deletion der Onkogene *StpC* und *Tip* die Replikation nicht beeinflusst.

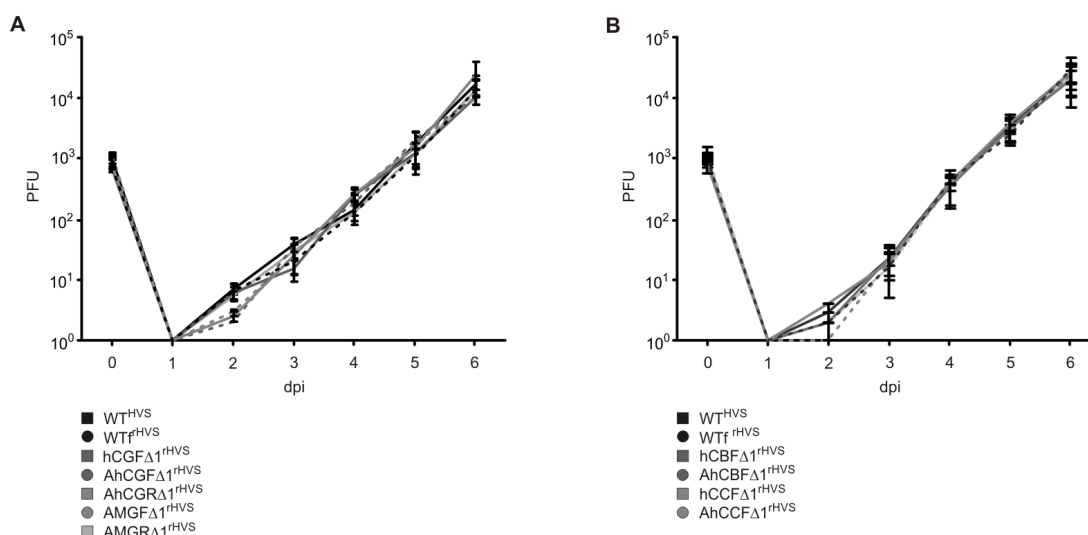


Abb. 4.21: Replikationskinetiken der rekonstituierten Viren. **A** Dargestellt sind das Wildtypvirus WT^{HVS} , das Wildtypvirus mit mini-F-Fragment WT^{F}^{HVS} und die verschiedenen Viren mit grünfluoreszierendem Protein als Transgen. **B** Dargestellt sind die Viren mit tBid oder der reversen Caspase 3 als Transgen. PFU: Plaque-bildende Einheiten; dpi: Tage nach der Infektion.

4.2.2 AFP-Produktion in den Tumorzellen

Zeitgleich zur Konstruktion und Rekonstitution der rekombinanten Viren wurden Hepatomzellen auf ihre AFP-Expression hin untersucht. Dazu wurde die RNA der verschiedenen Zelllinien mittels Trizol-Chloroform-Extraktion gewonnen und über Reverse-Transkriptase-PCR ausgewertet.

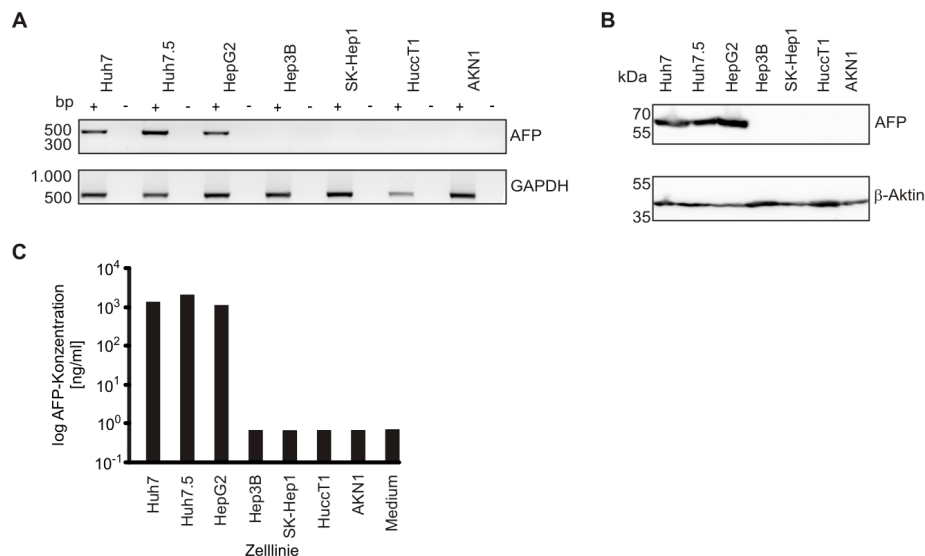


Abb. 4.22: RT-PCR, Western blot und elektrochemischer Lumineszenz-Immuntest als AFP-Nachweis. **A** Reverse-Transkriptase-PCR auf AFP und GAPDH der verschiedenen Zelllinien. Die Spuren zeigen die Ergebnisse mit (+) und ohne (-) Zugabe von reverser Transkriptase. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare. **B** Western blot mit Antikörpern gegen AFP und β-Aktin. kDa: Kilodalton. **C** AFP-Konzentrationen in den Überständen der verschiedenen Zelllinien.

Das Ergebnis zeigte, dass drei (Huh7, Huh7.5 und HepG2) von sieben Zelllinien das AFP-Gen transkribierten [Abb. 4.22A]. Die restlichen Zelllinien (Hep3B, SK-Hep1, HuccT1 und AKN1) zeigten keine Bande im Agarosegel. Als zelluläre Kontrolle wurden GAPDH-Transkripte untersucht. Diese Ergebnisse ließen sich durch die Analyse der AFP-Proteinmengen mittels Western blot in den Zellen bestätigen. Dabei diente β-Aktin als Ladekontrolle [Abb. 4.22B]. Der quantitative AFP-Nachweis mittels elektrochemischem Lumineszenz-Immuntest aus dem Kulturüberstand der Hepatomzellen erfolgte im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Dr. Sieg). Die nachgewiesenen AFP-Mengen waren in den Überständen der drei positiven Zelllinien vergleichbar. In den AFP-negativen Zellen oder im Referenzmedium war AFP auch hier nicht nachweisbar [Abb. 4.22C].

4.2.3 Zelltyp-spezifisch induzierbares eGFP

Nach der Rekonstitution und Titration der Virusvektoren wurden zuerst Versuche mit eGFP als Transgen durchgeführt, damit die optimalen Versuchsbedingungen für die Untersuchung proapoptotischer Gene definiert werden konnten. Dazu wurden alle sieben Hepatomzelllinien mit MOI=1 der verschiedenen Vektoren durch Spinokulation [Stevenson et al., 2000] transduziert, die eGFP-Expression mit Dox induziert und der prozentuale Anteil an eGFP-produzierenden Zellen nach 2 d bzw. einer Woche im Durchflusscytometer gemessen [Abb. 4.23].

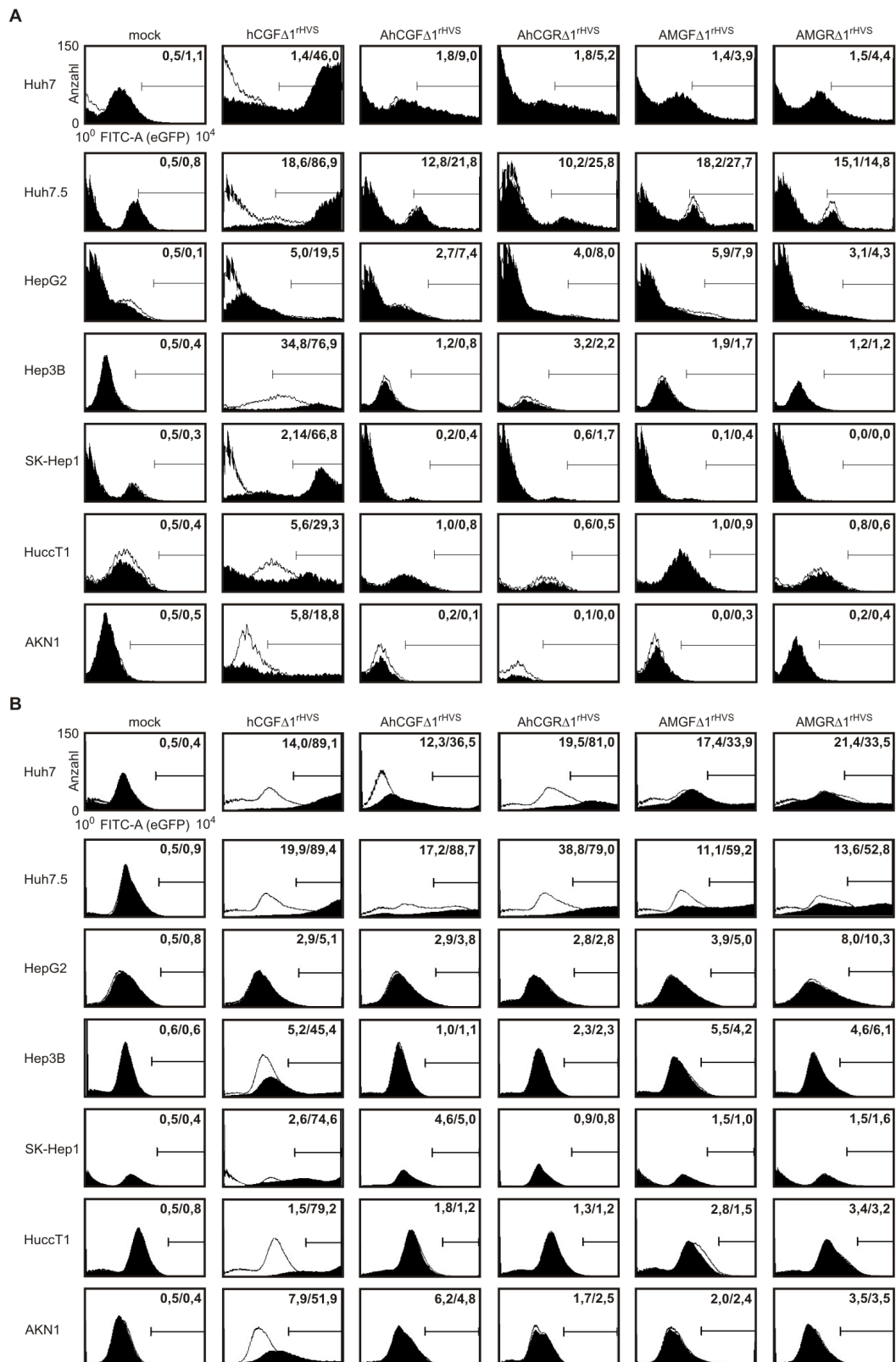


Abb. 4.23: Prozentualer Anteil an eGFP-produzierenden Hepatomzellen. Die Messung im Durchflusscytometer erfolgte **A** 2 d oder **B** eine Woche nach der Transduktion. Die weiße Kurve und der erste Wert sind die Ergebnisse ohne Dox-Zugabe, die schwarze Kurve und der zweite Wert mit Dox-Zugabe.

Kontroll-Virusvektoren ohne AFP-Regulation: hCGF Δ 1^{rHVS}

Nach Transduktion mit dem Ausgangsvektor ohne AFP-regulatorische Kassette (hCGF Δ 1^{rHVS}) war die Anzahl der eGFP exprimierenden Zellen bei den meisten Zelllinien (Huh7, Huh7.5, SK-Hep1, HuccT1 und AKN1) eine Woche nach der Transfektion höher als nach 2 d. Deshalb wurde dieser Zeitpunkt für die Versuche mit den Viren gewählt, die proapoptotische Gene tragen. Nach Zugabe von Dox konnte eine eGFP-Expression in jeder Zelllinie nachgewiesen werden. Somit war es möglich, Unterschiede in der Anzahl der fluoreszierenden Zellen nachzuweisen, die mit den Virusvektoren transduziert worden waren, welche die regulatorische AFP-Kassette enthalten. Ohne Dox-Zugabe war eine schwache eGFP-Expression in allen Zellen vorhanden. Besonders stark war diese Hintergrundexpression (*leakiness*) bei der Zelllinie Hep3B 2 d nach der Infektion (34,8 %). Die Anzahl der leuchtenden Zellen sank nach einer Woche jedoch wieder auf 5,2 %. Die meisten Zelllinien zeigten eine Hintergrundexpression von 1,4 - 7,9 %.

Virusvektoren mit AFP-Regulation: AhCG(F/R) Δ 1^{rHVS} und AMG(F/R) Δ 1^{rHVS}

Auch nach Transduktion mit AFP-regulierten Virusvektoren zeigten eine Woche nach der Transduktion deutlich mehr Zellen eine eGFP-Expression [Abb. 4.23]. Bei den AFP-positiven Zelltypen exprimierten jedoch durchgehend weniger Zellen eGFP als bei den Kulturen, die mit dem Ausgangsvirus hCGF Δ 1^{rHVS} transduziert worden waren. Diese Anzahl fluoreszierender Zellen war auf bis zu 8,3 % reduziert. Jedoch zeigte sich, dass bei den AFP-negativen Zelllinien im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Virus hCGF Δ 1^{rHVS} keine oder nur sehr wenige Zellen eine eGFP-Expression aufwiesen. Somit konnte die Zelltyp-spezifische Regulation über die AFP-regulatorische Kassette nachgewiesen werden. Auch wenn die besonders hohe Expressionsstärke durch den konstitutiv aktiven Cytomegalovirus-Promotor nicht erreicht werden konnte, erwies sich die Transgenexpression durch die AFP-regulierten Vektoren als streng abhängig von der AFP-Expression.

Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung wurden die Zelllinien mit den verschiedenen Virusvektoren transduziert und nach einer Woche im Fluoreszenzmikroskop untersucht [Abb. 4.24]. Die Ergebnisse deckten sich weitestgehend mit den im Durchflusscytometer gewonnenen Daten. Allerdings zeigte unter dem Mikroskop Huh7 und nicht Huh7.5 die stärkste Expression. Zudem war die Expression in der Zelllinie HuccT1 stärker, als es die vorherigen Daten vermuten ließen. Insgesamt war die eGFP-Expression unter AFP-Kontrolle des Tet-Schalters in AFP-negativen Zellen strikt

abgeschaltet und lässt sich nur Zelltyp-spezifisch induzieren.

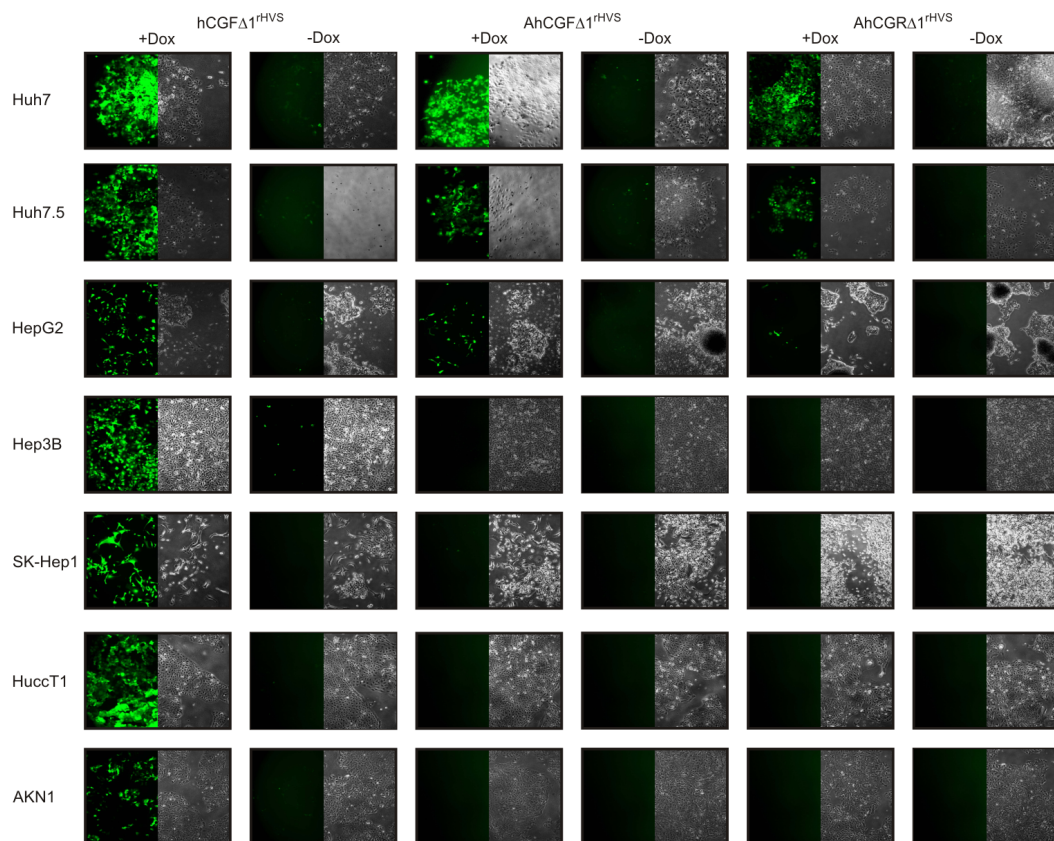


Abb. 4.24: Fluoreszenzmikroskopie der eGFP-produzierenden Hepatomzellen. Die verschiedenen Hepatomzelllinien (AKN1, HepG2, Hep3B, HuccT1, Huh7, Huh7.5, SK-Hep1) wurden mit den eGFP-tragenden Virusvektoren transduziert und mit Dox induziert. Nach einer Woche erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der linke Teil eines jeden Bildes zeigt die Fluoreszenzaufnahme der rechte Teil die dazugehörige Durchlichtaufnahme. Die Bilder sind von Zellen mit (+Dox) und ohne (-Dox) Zugabe von Dox.

4.2.4 Versuche zur Induzierbarkeit der Apoptose in Hepatomzellen

Nach Ermittlung der Transduktionsparameter mit Hilfe von eGFP als Transgen wurden die gewonnenen Daten auf die Virusvektoren mit den proapoptotischen Transgenen übertragen. Exemplarisch wurden drei Zelllinien ausgewählt: Huh7.5 (AFP-positiv), Hep3B und SK-Hep1 (beide AFP-negativ).

Darstellung der PARP-Spaltung mittels Westernblot

Eine Woche nach Transduktion mittels Spinokulation [Stevenson et al., 2000] der Zelllinien Huh7.5, Hep3B und SK-Hep1 mit den Virusvektoren, die proapoptotische Transgene tragen, wurde jeweils die Hälfte der Zellen für 6 h mit oder ohne Dox kultiviert. Die Lysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf PARP-Spaltung analysiert.

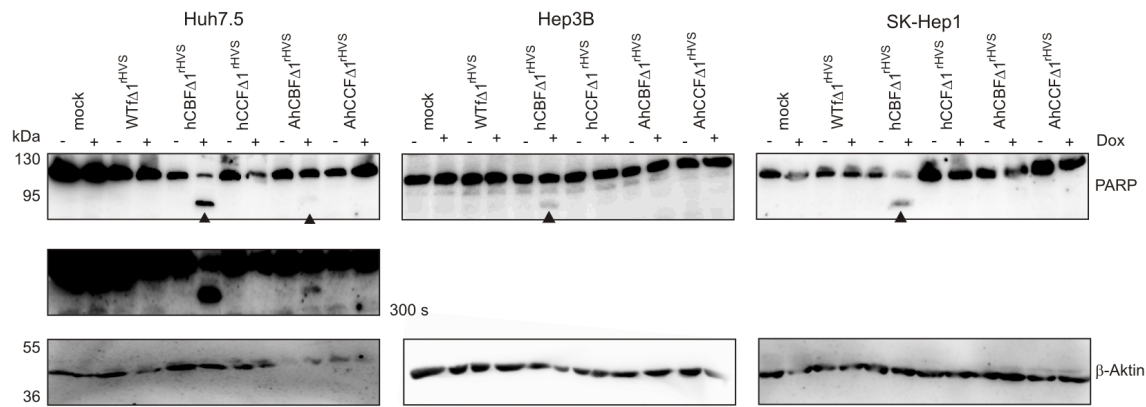


Abb. 4.25: Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Nachweis mittels Westernblot. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Hepatomzellen Huh7.5, Hep3B und SK-Hep1. In den oberen Bildern sind die Banden der ungespaltenen (113 kDa) und gespaltenen (89 kDa) PARP dargestellt. In der zweiten Reihe ist der Blot von Huh7.5 mit einer Belichtungszeit von 300 s gezeigt. In der untersten Reihe befindet sich der Nachweis von β -Aktin (42 kDa). kDa: Kilodalton.

Zum Nachweis der Apoptose wurde ein Antikörper gegen Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) verwendet, da der proteolytische Abbau von PARP durch die Caspase 3 ein wesentlicher Schritt im Apoptose-Signalweg ist. β -Aktin (42 kDa) diente als zelluläre Kontrolle. Die Zellen, die mit den Virusvektoren zur Expression der reversen Caspase 3 ((A)hCCF $\Delta 1^{rHVS}$) transduziert worden waren, zeigten im Westernblot keine PARP-Spaltung (113 kDa - komplette PARP) [Abb. 4.25]. Dieses Ergebnis stimmte mit den Ergebnissen aus einer vorangegangenen Diplomarbeit und Dissertation überein [Hüske, 2010; Toptan, 2010b]. Die Zellen, die mit den AFP-unabhängigen tBid-Virusvektoren (hCBF $\Delta 1^{rHVS}$) transduziert worden waren, zeigten eine deutliche PARP-Spaltung (89 kDa - gespaltenes PARP-Fragment). Bei Huh7.5 war die PARP-Spaltung bei den Vektoren ohne und mit regulatorischer AFP-Kassette zu erkennen. Bei den AhCBF $\Delta 1^{rHVS}$ -transduzierten Huh7.5-Zellen wurde die Bande erst nach längerer Belichtungszeit deutlich sichtbar. Bei den AFP-negativen Zelllinien Hep3B und SK-Hep1 war die Bande des gespaltenen PARPs nur bei den Zellen zu finden, die mit den Vektoren ohne regulatorische AFP-Kassette (hCBF $\Delta 1^{rHVS}$) transduziert worden waren. Die PARP-Spaltung war somit ebenfalls strikt abhängig von der AFP-Produktion der Zellen.

Apoptosenachweis mittels Annexin-V-Propidiumiodid-Test

Die Apoptose wurde sodann mit dem Annexin-V-Propidiumiodid-Test nachgewiesen. Dazu wurden die Hepatomzelllinien mit den tBid-exprimierenden Vektoren transduziert und eine Woche kultiviert. Am d 6 der Kultivierung wurde Dox zu einer Serie der Kulturen gegeben, während die Kontrollkulturen unbehandelt blieben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Propidiumiodid sowie einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen Annexin V markiert. Die

Auswertung im Durchflusscytometer ergab, dass die Apoptose in allen Zellen induziert werden konnte, die mit dem hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ -Virusvektor infiziert worden waren. Die prozentualen Werte der Färbungen waren bei den Zellen mit Dox deutlich erhöht [Abb. 4.26].

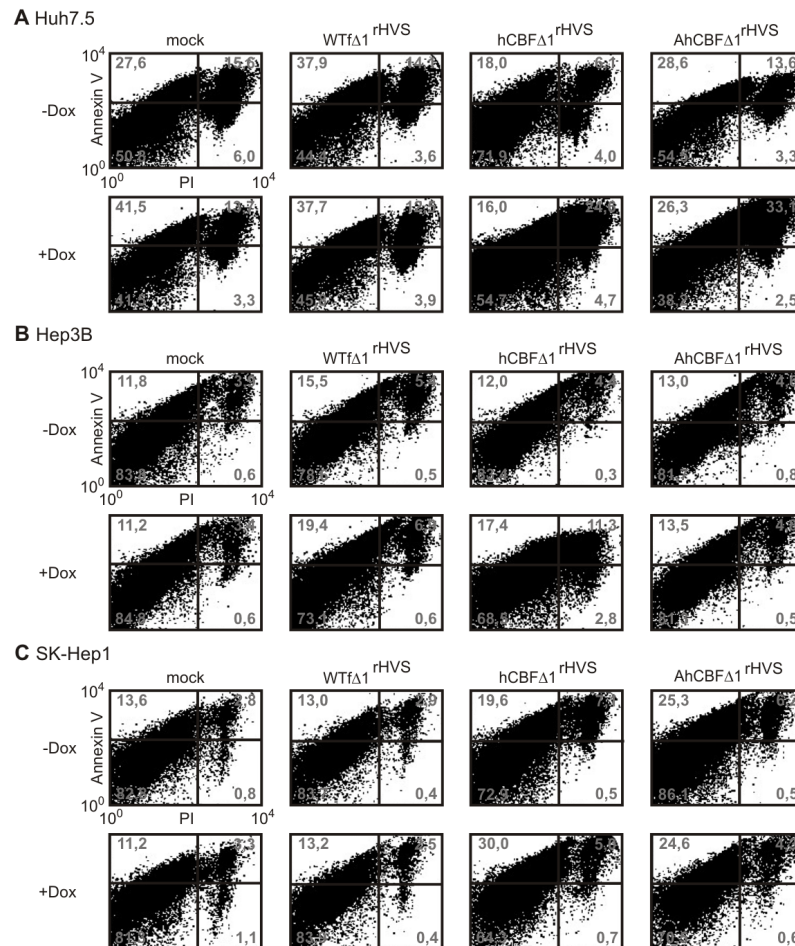


Abb. 4.26: Annexin-V-Propidiumiodid-Test mit transduzierten Hepatomzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusscytometrie. Die drei Zelllinien (**A** Huh7.5, **B** Hep3B und **C** SK-Hep1) wurden mit den tBid-exprimierenden Vektoren transduziert und nach einer Woche für 24 h mit Dox induziert. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) und einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen Annexin V inkubiert und im Durchflusscytometer ausgewertet.

Die Zelllinie SK-Hep1 zeigte eine Zunahme in der Annexin-V-Färbung um 10,4 % [Abb. 4.26C]. Bei den Hep3B-Zellen zeigt sich eine Steigerung der Annexin-V- (5,4 %) und Propidiumiodid-gefärbten Zellen (6,9 %) [Abb. 4.26B]. Bei der Zelllinie Huh7.5 stieg die Anzahl der Zellen, die sich mit Propidiumiodid markieren lassen um 18,5 % [Abb. 4.26A]. Nur die AFP-positive Zelllinie Huh7.5 zeigte nach der Transduktion mit dem Virusvektor mit regulatorischer AFP-Kassette (AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$) eine Steigerung der Propidiumiodid-Färbung um 19,5 %. Somit war die Apoptose auch in diesem Versuch strikt AFP-abhängig. Der Unterschied der Trans-

genexpression, der sich zwischen den Viren mit und ohne regulatorische AFP-Kassette in Huh7.5-Zellen in der Vorversuchen und im Westernblot zeigte, konnte hier aber nicht wiederholt werden. Die Induktion der Transgenexpression verursachte in den Zellen unabhängig vom verwendeten Virus eine vergleichbare Apoptoseinduktion.

Apoptosenachweis im TUNEL-Test

Zur visuellen Verdeutlichung der Apoptose wurde 6 h nach Dox-Induktion ein TUNEL-Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop und im Fluorimeter.

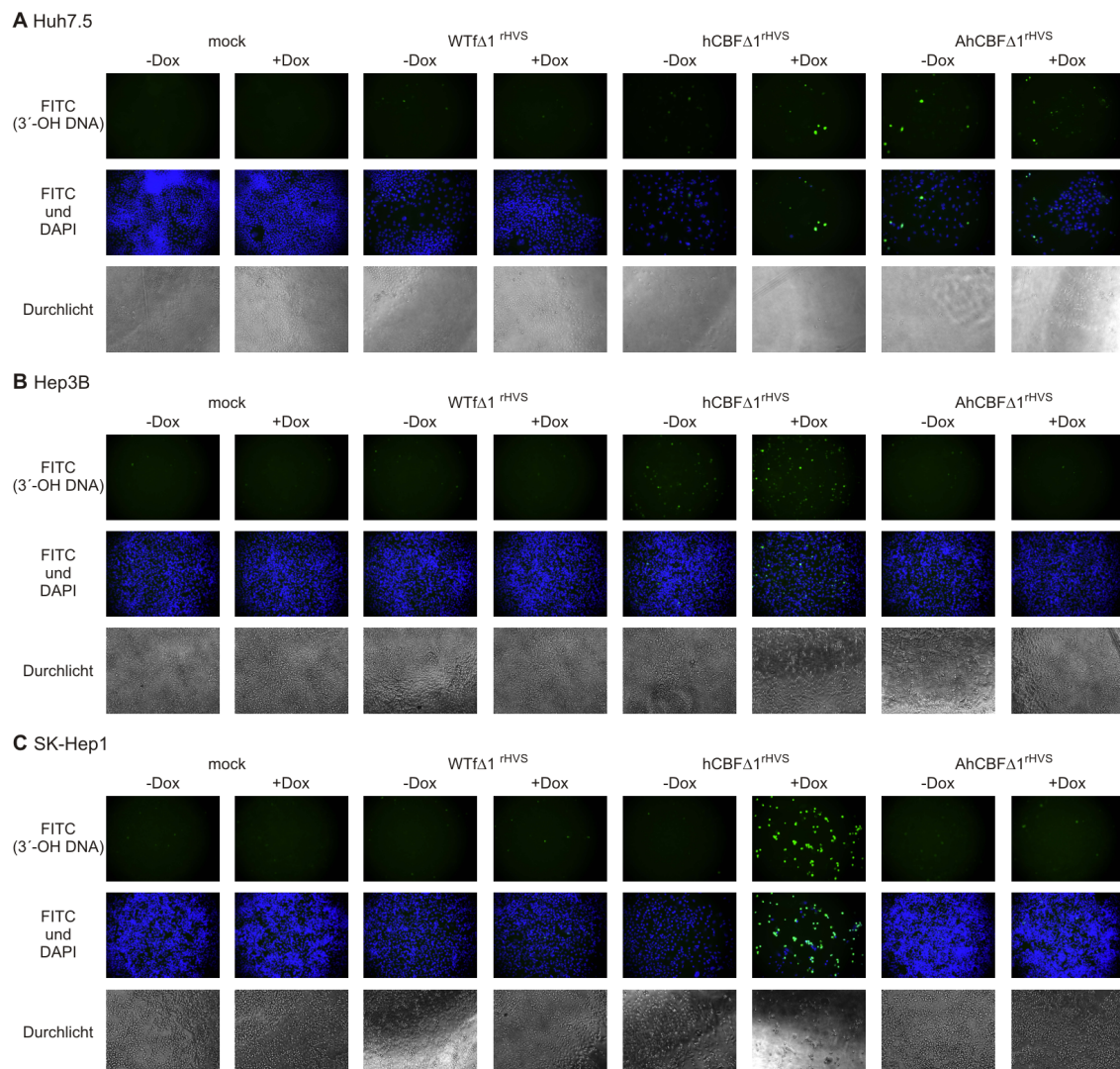


Abb. 4.27: TUNEL-Test der transduzierten Hepatomzellen. Die Zellen (**A** Huh7.5, **B** Hep3B und **C** SK-Hep1) wurden mit den tBid-tragenden Virusvektoren transduziert und eine Woche später für 6 h mit Dox induziert. Die fragmentierte DNA wurde an ihren freien 3'-Hydroxylgruppen mit FITC-markierten Nukleotiden versehen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wurden. Zum Vergleich der Zelldichte wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und zusätzlich wurde jeweils eine Aufnahme im Durchlichtmodus gemacht.

Die Mikroskopbilder zeigten eine Abnahme der DAPI-Färbung bei allen Zellen, die mit dem Virusvektor hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ transduziert waren und zusätzlich bei den Huh7.5-Zellen, die mit dem AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ -Virus transduziert worden waren [Abb. 4.27]. FITC-gekoppelte Nukleotide wurden an die freien 3'-Hydroxylgruppen der DNA-Bruchstücke angebaut und machten diese durch ihre grüne Fluoreszenz sichtbar. Diese grüne Fluoreszenz war in den Ansätzen mit schwacher DAPI-Färbung besonders ausgeprägt.

Tab. 4.2: Messung im Fluorimeter. Dieselbe Platte, die im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde, wurde auch mit dem Fluorimeter quantifiziert. Die Messung erfolgte für FITC bei einer Anregungswellenlänge von 483 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm. Für die DAPI-Färbung wurden Wellenlängen von 350 zu 470 nm gewählt. RFU: relative Fluoreszenzeinheit.

Tumorzelllinie	Virus	Dox	RFU Fluorescein/ RFU DAPI
Huh7.5	mock	ohne	0,70
		mit	0,64
	WTf $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	0,86
		mit	0,97
	hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	16,88
		mit	37,17
	AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	2,91
		mit	6,24
Hep3B	mock	ohne	2,64
		mit	2,27
	WTf $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	2,24
		mit	2,38
	hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	1,99
		mit	4,43
	AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	2,23
		mit	2,67
SK-Hep1	mock	ohne	2,45
		mit	1,94
	WTf $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	2,02
		mit	1,75
	hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	5,96
		mit	29,78
	AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$	ohne	2,08
		mit	1,97

Zur Quantifizierung wurde eine Messung am Fluorimeter durchgeführt und die relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescence unit*, RFU) der Fluorescein-Färbung und der DAPI-Färbung bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Quotient bestimmt (RFU Fluorescein/RFU DAPI) [Tab. 4.2]. Diejenigen Ansätze, die bereits im Propidiumiodid-Annexin-V-Test eine Apoptose-

Induktion gezeigt hatten, wiesen hier eine deutliche Steigerung des Quotienten der relativen Fluoreszenzeinheiten auf. Diese ist bei den Zelllinien Huh7.5 und SK-Hep1 bei der nicht-AFP-abhängigen Variante besonders hoch (Huh7.5: 58-fach; SK-Hep1: 15-fach). Bei der AFP-abhängigen Variante ist nur bei Huh7.5 eine Zunahme um das 7-fache nachweisbar. Die nicht transduzierten Zellen und die mit $WTf\Delta 1^{rHVS}$ -transduzierten Zellen wiesen denselben Quotienten auf. Somit konnte dieser Wert als Hintergrund angenommen werden. In diesem Versuch stellte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der viralen Transduktion mit ubiquitär aktiver PGK-Regulation oder mit AFP-regulatorischer Kassette dar. Im Fall der AFP-regulierten Vektoren war wiederum für Huh7.5 die AFP-spezifische Induktion nachweisbar, die bei den AFP-negativen Zelllinien Hep3B und SK-Hep1 fehlte.

Freisetzung von Laktatdehydrogenase aus apoptotischen Zellen

Zuletzt wurde der LDH-Test als Nachweis der induzierten Apoptose durchgeführt. Dazu wurden die Zellen transduziert, für eine Woche kultiviert und 24 h vor dem Versuch mit Dox induziert.

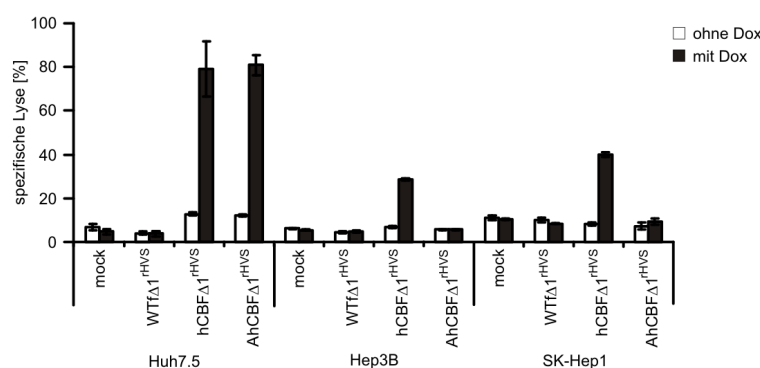


Abb. 4.28: Laktatdehydrogenase-Test der transduzierten Hepatomzellen. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit Virusvektoren transduziert und nach einer Woche wurde die Apoptose mittels Dox induziert. Der Überstand wurde quantitativ auf die freigesetzte LDH-Menge untersucht. Die Auswertung erfolgte im Fluorimeter.

Hier zeigte sich erneut kein Unterschied bei der Apoptoseinduktion im Bezug auf den verwendeten Virusvektor bei der Zelllinie Huh7.5. Beide Viren erreichten eine Induktion der Apoptose von ca. 80 % [Abb. 4.28]. Die Induktion der Apoptose in Hep3B-Zellen war wie in vorherigen Versuchen mit dem Vektor ohne AFP-regulatorische Kassette ($hCBF\Delta 1^{rHVS}$) deutlich geringer als in Huh7.5-Zellen (28 % zu 79 %). Bei den Zellen, die mit dem Virusvektor mit der AFP-regulatorischen Kassette ($AhCBF\Delta 1^{rHVS}$) transduziert worden waren, war LDH im Überstand nicht detektierbar. Der Wert lag im Bereich des Hintergrunds nicht transduzierter oder mit

WTf $\Delta 1^{\text{HVS}}$ -transduzierter Zellen. Bei SK-Hep1 zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Hep3B. Hier war allerdings der prozentuale Anteil der freigesetzten LDH und somit die spezifische Lyse bei den Zellen etwas höher (40 %), die mit dem Vektor ohne AFP-regulatorische Kassette (hCBF $\Delta 1^{\text{HVS}}$) transduziert waren. Alle anderen SK-Hep1-Zellen zeigten keine erhöhte LDH-Freisetzung, wobei der Hintergrundwert höher war als bei den Zelllinien Huh7.5 und Hep3B. Die Apoptose-Induktion bei Verwendung AFP-regulierter Vektoren war auch hier stark AFP-spezifisch.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse belegen, dass eine AFP-abhängige Expression der proapoptotischen Transgene möglich ist. In Zellen ohne AFP-Expression findet hier keine Transgenexpression statt. Die in Vorversuchen mit eGFP, im Westernblot und TUNEL-Test angedeutete Reduktion der Transgen-Expression durch den Einbau der AFP-regulatorischen Kassette in das Ausgangsvektor (hCBF $\Delta 1^{\text{HVS}}$) konnte hier nicht bestätigt werden. Der Annexin-V-Propidiumiodid-Test und der LDH-Test belegen, dass mit den PGK- bzw. AFP-regulierten Vektoren vergleichbare Werte für die Quantität der induzierten Apoptose erreicht werden. Die *Leakiness* des Systems bleibt bei beiden Vektorvarianten in AFP-positiven Zellen vorhanden. In AFP-negativen Zelltypen ist der Hintergrund von demjenigen nicht-transduzierter Zellen kaum zu unterscheiden.

4.3 T-Zell-spezifische Expression durch den CD2-Enhancer-Promotor

Als Ausgang für dieses Projekt dienten die Daten aus der vorangegangenen Diplomarbeit [Hüske, 2010]. Darin wurden Viren mit Tet-regulatorischer Kassette und verschiedenen Transgenen (eGFP, reverse Caspase 3 und tBid) und Promotoren (PGK- und HTLV- $\text{EF1}\alpha$ -Promotor) an einer Position oberhalb von *ORF1* (*stpC/tip*) hergestellt. Humane T-Lymphozyten wurden mit diesen Vektoren transduziert, die Transgenexpression durch Zugabe von Dox induziert und die Transgenexpression bzw. Apoptoserate ermittelt. Dabei stellte es sich heraus, dass die Apoptose nur in Jurkat-Zellen induziert werden konnte. Der entsprechende Vektor besaß die regulatorische Kassette in reverser Orientierung mit einem chimären Promotor aus der Enhancer-Promotorsequenz des HTLV-1 und des Promotors für $\text{EF1}\alpha$. Außerdem konnte die Apoptose nur durch das Transgen tBid und nicht durch die reverse Caspase 3 induziert werden. Die regulatorischen Sequenzen des T-Zell-spezifischen CD2-Gens sollten zur Optimierung dieses Systems für humane T-Lymphozyten eingesetzt werden.

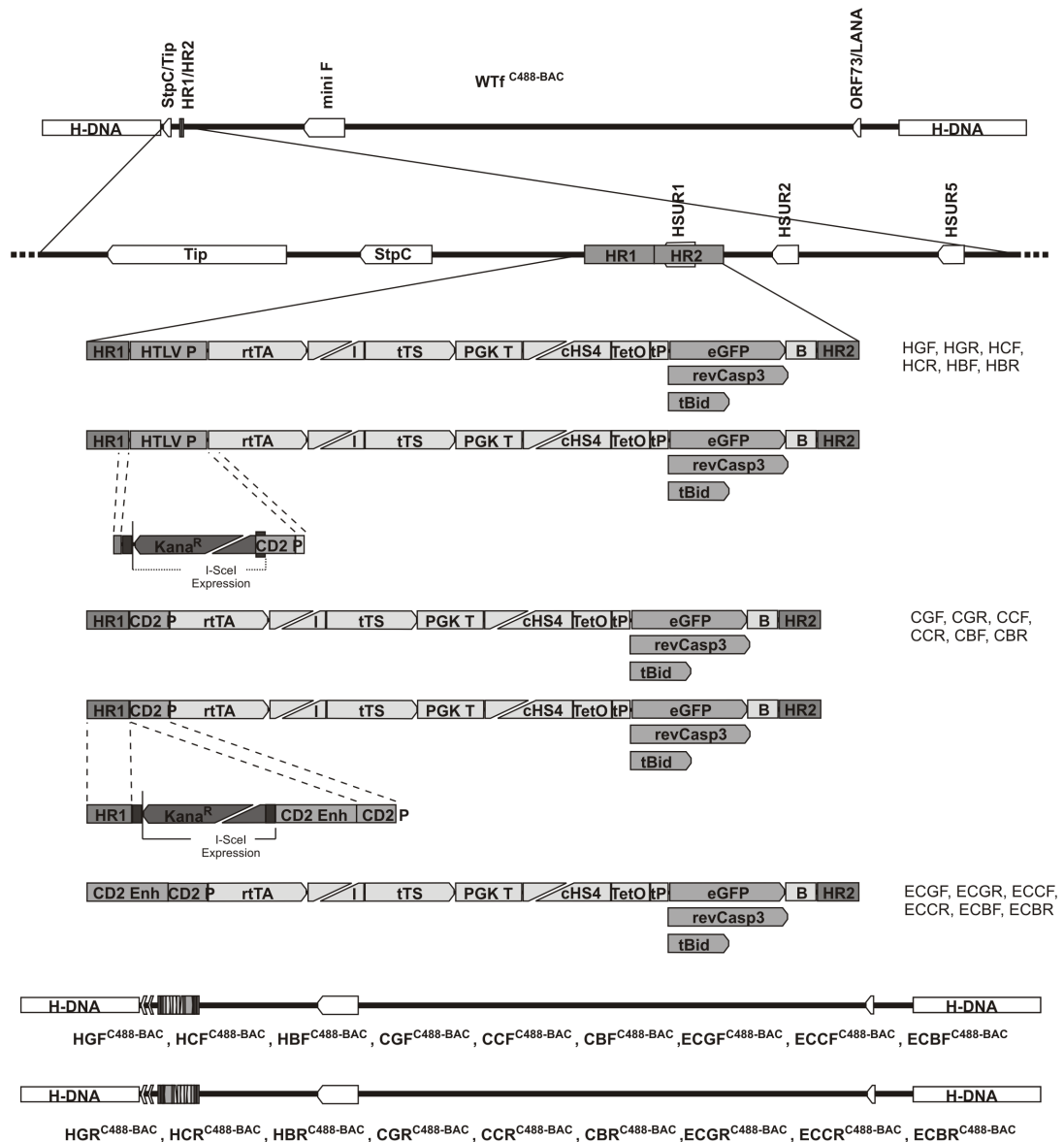


Abb. 4.29: Rekombinante WTf^{C488-BAC} mit CD2-Elementen in einem Tet-regulierten Konstrukt.

Dargestellt ist die schrittweise Insertion des CD2-Promotors und des CD2-Enhancers in die bereits vorhandene Tet-regulatorische Transgenkassette hinter dem *ORF1*. Die Insertionen erfolgten sowohl in Konstrukte mit einer direkten als auch einer reversen Orientierung der Kassette. B: Terminator des Gens für das bovine Wachstumshormon; ^{C488-BAC}: BAC; CD2-Enh: CD2-Enhancer aus humanen T-Lymphozyten; CD2 P: CD2-Promotor aus humanen T-Lymphozyten; CG/C/B(F/R): CD2-Promotor mit eGFP/reverser Caspase 3/tBid in direkter/reverser Orientierung; cHS4: Hühner-β-Globin-Isolator; ECG/C/B(F/R): CD2-Enhancer-Promotor mit eGFP/reverser Caspase 3/tBid in direkter/reverser Orientierung; eGFP: verstärktes grün fluoreszierendes Protein; HG/C/B(F/R): HTLV-EF1α-Promotor mit eGFP/reverser Caspase 3/tBid in direkter/reverser Orientierung; HR1: Homologe Region 1; HR2: Homologe Region 2; HSUR: HVS-U-RNA; HTLV P: Fusionspromotor aus dem Promotor des humanen T-lymphotropen Virus Typ 1 und des Promotors für den Elongationsfaktor 1α; I: interne ribosomale Eintrittsstelle des Poliovirus; Kana^R: Kanamycin-Resistenzkassette; LANA: Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen; ORF: offener Leserahmen; PGK T: Phosphoglyceratkinase-Terminator; revCasp3: reverse Caspase 3; rtTA: reverser Tet-abhängiger Transaktivator; StpC: Saimiri-transformationsassoziiertes Protein der Untergruppe C; tBid: verkürztes Bid; TetO: Tet-Operator; Tip: Tyrosinkinase-interagierendes Protein; tP: Promotor des humanen Cytomegalovirus; tTS: Tet-abhängiger Transsilencer.

Dazu wurde der HTLV-EF1 α -Promotor durch den CD2-Promotor bzw. durch den CD2-Enhancer-Promotor ersetzt.

4.3.1 Virusvektoren mit regulatorischen Elementen des CD2-Gens

Zu Beginn wurde ein Lysat aus humanen T-Lymphozyten hergestellt, aus dem mittels PCR der CD2-Enhancer- bzw. Promotor-Bereich amplifiziert wurde. Diese wurden in den Übergangsvektor pJET1.2/blunt inseriert. Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde nach ihrer Amplifikation in die gleichen Vektoren ligiert. Das komplette Konstrukt aus CD2-Promotor und Kanamycin-Kassette wurde im nächsten Schritt mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut und in elektrokompente *E. coli*-Zellen elektroporiert, die das Ausgangs-BACs enthielten. Nach der erfolgreichen *En passant*-Mutagenese wurden die entstandenen Klone dazu verwendet, nach dem gleichen Prinzip den CD2-Enhancer vor den CD2-Promotor in das BAC zu rekombinieren [Abb. 4.29]. Die Klonierungen wurden mittels RFLP-Analyse überprüft [Abb. 4.30].

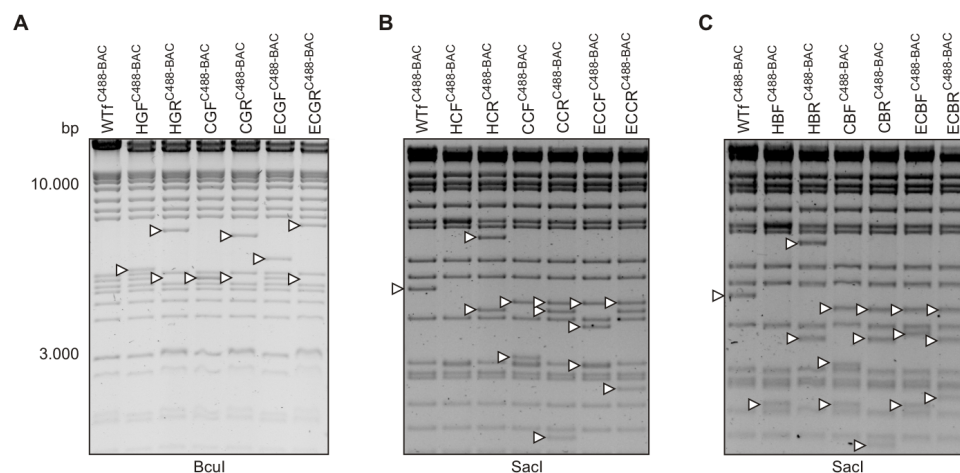


Abb. 4.30: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse von BAC-DNA. Die BACs mit **A** eGFP, **B** reverser Caspase 3 und **C** tBid wurden mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Pfeilspitzen deuten auf die Unterschiede im Bandenmuster hin. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare

Die entstandenen Bandenmuster entsprachen den Erwartungen. Die verschiedenen Viren wurden nach ihrer Rekonstitution in ihrer Replikationskinetik verglichen und zeigten vergleichbare Replikationskurven [Abb. 4.31].

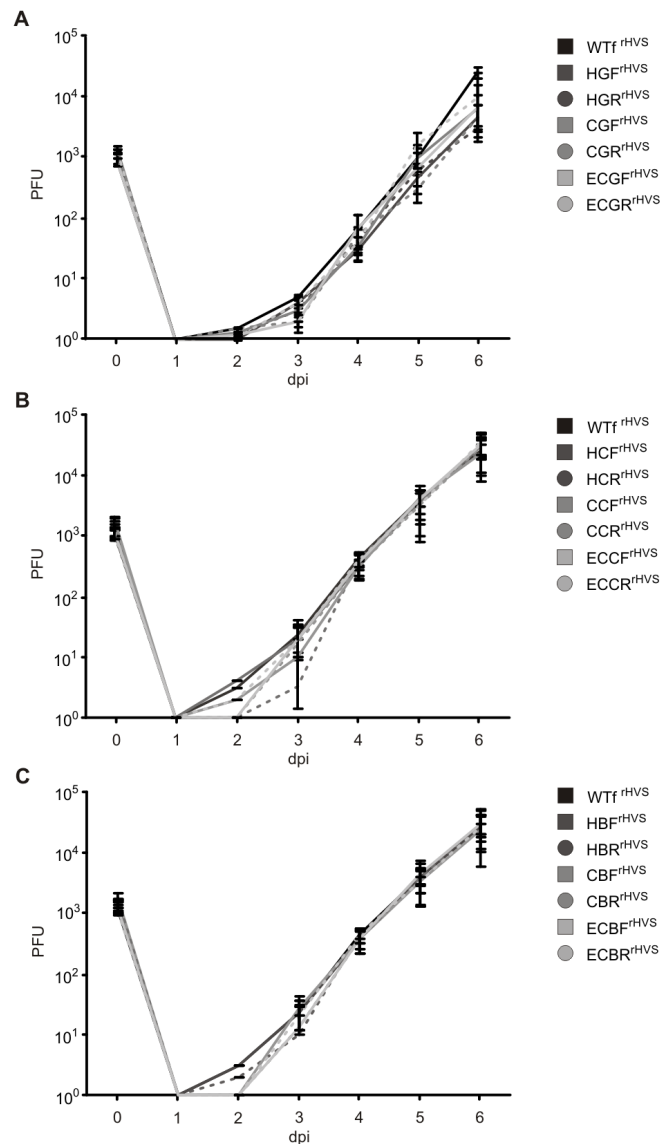


Abb. 4.31: Replikationskinetiken der verschiedenen Viren. Dargestellt ist die Replikation der Viren mit **A** eGFP, **B** reverse Caspase 3 und **C** tBid. PFU: Plaque-bildende Einheiten; dpi: Tage nach der Infektion.

4.3.2 T-Zell-spezifisch induzierbares eGFP

Für Vorversuche wurden humane T-Lymphozyten aus Spenderblut (K32) isoliert und mittels Spinokulation [Stevenson et al., 2000] mit den verschiedenen eGFP-tragenden Viren transduziert. Bei einer Serie aller Transduktionen wurde die Transgenexpression durch die Zugabe von Dox induziert, eine andere Serie verblieb ohne Induktion. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Durchflusscytometer und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre eGFP-Expression hin untersucht [Abb. 4.32]. Das Maximum an eGFP-exprimierenden Zellen war 2 d nach der Transduktion erreicht (7,6 - 34,8 %). Danach nahm die Anzahl fluoreszierender Zellen über bis zu vier Wochen ab, bis fast keine Zellen mehr eine grüne Fluoreszenz aufwiesen

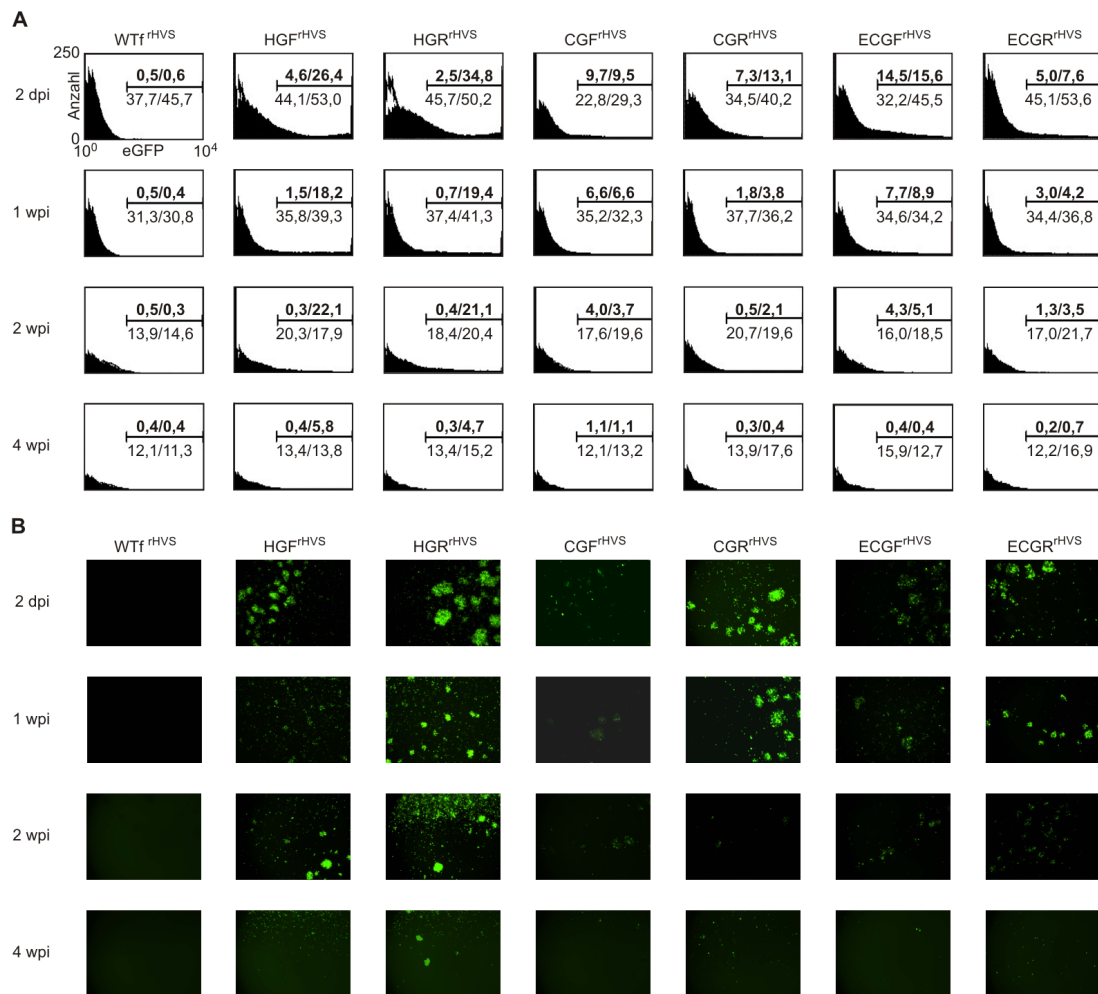


Abb. 4.32: Darstellung der eGFP-exprimierenden humanen T-Lymphozyten. **A** Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie. Oberhalb des Markers: Vergleich der fluoreszierenden Zellen ohne (weiß) und mit (schwarz) Zugabe von Dox. Unterhalb des Markers: Vergleich lebender Zellen ohne und mit Zugabe von Dox. **B** Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie: Verwendung der 10x Vergrößerung und des FITC-Filters.

(0,4 - 5,8 %). Die transduzierten Zellen mit der Transgenkassette in reverser Orientierung zeigten zudem eine höhere Expression als solche Zellen mit dem Insert in direkter Orientierung. Der Einbau der T-Zell-spezifischen CD2-Elemente zeigte keine Steigerung der eGFP-Expression im Vergleich zum HTLV-EF1 α -Promotor, sondern eher eine Reduktion. In An- oder Abwesenheit des CD2-Enhancers ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede. Die Vitalität der Zellen nahm über den gesamten Versuchszeitraum von vier Wochen ständig ab. Im Vergleich zu allen anderen Varianten war die eGFP-Expression bei den Vektoren mit dem HTLV-EF1 α -Promotor am stärksten ausgeprägt und dauerte am längsten an.

4.3.3 Induzierbarkeit der Apoptose in T-Lymphozyten

Im Anschluss an die eGFP-Experimente wurden humane T-Lymphozyten des Spenders K32 mit den Virusvektoren transduziert, die die regulatorische Kasette mit einem der proapoptotischen Gene reverse Caspase 3 oder tBid tragen [Abb. 4.33]. Die Zellen wurden nach 2 d für 6 h mit Dox induziert, geerntet und mit Propidiumiodid und einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen Annexin V gefärbt. Die Auswertung im Durchflusscytometer zeigte bei keiner Probe einen Anstieg der Färbung bei einem der beiden Reagenzien.

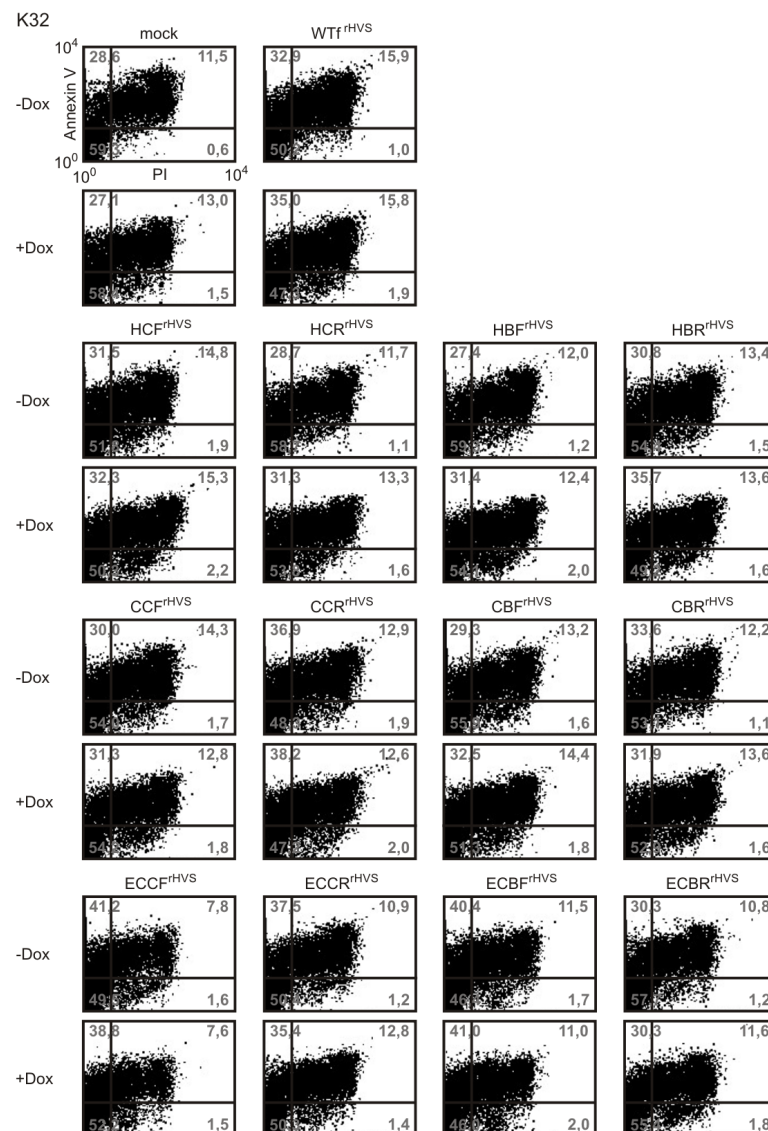


Abb. 4.33: Darstellung der induzierten Apoptose in humanen T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten des Spenders K32 wurden transduziert und nach einer Woche für 6 h mit Dox induziert. Die Auswertung erfolgte mittels Annexin-V-Propidiumiodid-Test im Durchflusscytometer. K: Lymphozytenspender; PI: Propidiumiodid.

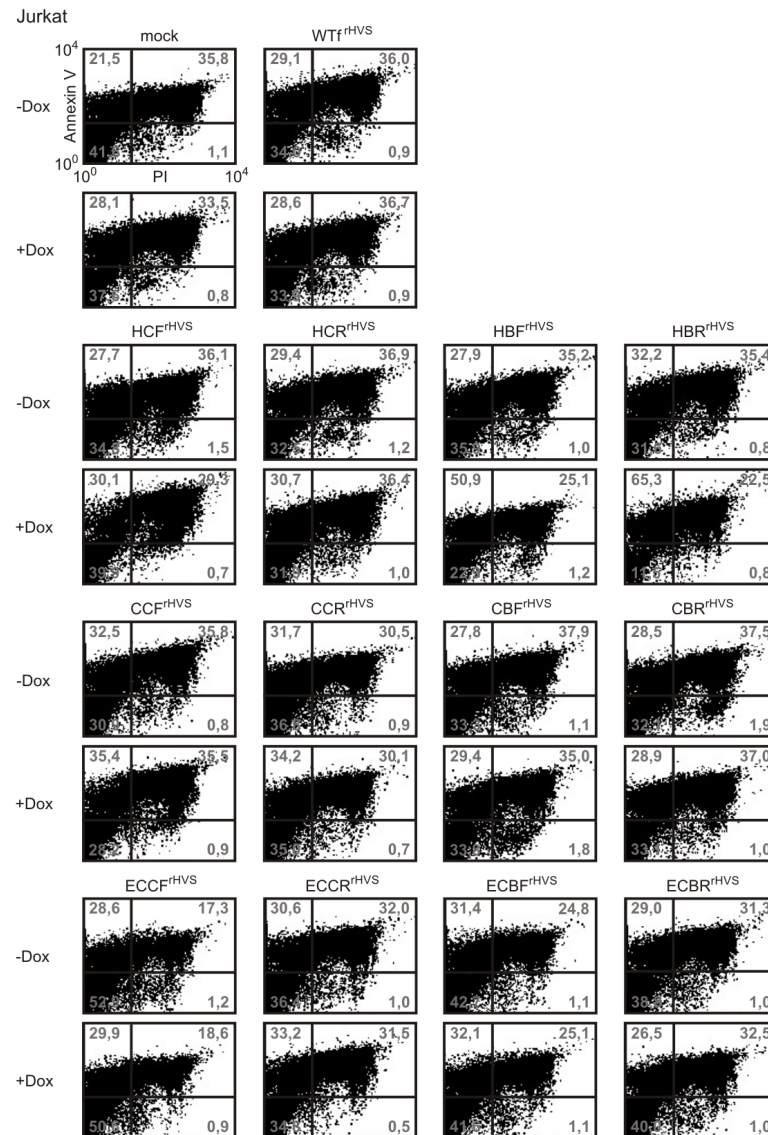


Abb. 4.34: Darstellung der induzierten Apoptose in Jurkat-Zellen. Jurkat-Zellen wurden transduziert und nach einer Woche 6 h mit Dox induziert. Die Auswertung erfolgte mittels Annexin-V-Propidiumiodid-Test im Durchflusscytometer. PI: Propidiumiodid.

Deshalb wurden in einem zweiten Versuchsansatz Jurkat-Zellen mit denselben Virusvektoren transduziert, induziert, geerntet, gefärbt und analysiert [Abb. 4.34]. Ein deutlicher Anstieg der Annexin-V-Färbung zeigte sich nach Induktion der Zellen, die mit den Virusvektoren HBF^{rHVS} und HBR^{rHVS} transduziert wurden. Der Anteil der Annexin V-gefärbten Zellen nahm um 23,0 % (HBF^{rHVS}) bzw. um 33,1 % (HBR^{rHVS}) zu. Eine Steigerung der Apoptosemerkmale bei den Zellen, die mit den CD2-regulierten Virusvektoren transduziert worden waren, war aber nicht festzustellen. Die regulatorischen Elemente des CD2-Gens waren also nicht geeignet, eine verbesserte T-Zell-spezifische Transgenexpression durch den rhadinoviralen Vektor zu erreichen.

4.4 Glykoprotein 130

In der Abteilung Physiologie an der Medizinischen Universität Innsbruck wurde eine Mausmutante etabliert, die einen konditionalen gp130-Defekt in den nozizeptorischen Neuronen besitzt [Andratsch et al., 2009]. Für Versuche mit diesen Mäusen wurden Virusvektoren hergestellt, die ein bicistronisches Konstrukt aus gp130 und dsRed exprimieren. Konstrukte mit verschiedenen Promotoren unter Dox-induzierten oder konstitutiv exprimierenden Bedingungen wurden in verschiedenen Orientierungen kloniert. Zusätzlich wurden Virusvektoren für das Transgen *Sprr1A* hergestellt, da dieses Transkript in diesem Zusammenhang stark differenziell reguliert wird [Prof. Kress, Innsbruck].

4.4.1 Virusvektoren mit konstitutiver oder induzierter Expression von gp130 und dsRed

Als Ausgangsplasmide dienten pIRES-dsRed, pSVL-gp130 und pcDNA3.1(-)n-H *Sprr1A*, die von Frau Prof. Kress erhalten wurden. Aus den ersten beiden Plasmiden wurde eine Variante mit der Konfiguration gp130-IRES-dsRed erstellt. Nach Amplifikation und Ligation in den Übergangsvektor pCR2.1 wurden die beiden Promotoren (hCMV- oder HTLV-EF1 α -Promotor) in den gp130-dsRed-Vektor inseriert. Danach wurde die Kanamycin-Resistenzkassette auf die gleiche Art eingesetzt. Die verschiedenen homologen Bereiche für die konstitutive oder induzierte Expression wurden parallel zu dem beschriebenen Ansatz amplifiziert und in den pCR2.1 kloniert. Vor der Rekombination wurde das Konstrukt aus Promotor, gp130, Kanamycin-Resistenzkassette, IRES und dsRed zwischen die homologen Bereiche N75-C75, C75-N75 oder tetO-polyA kloniert.

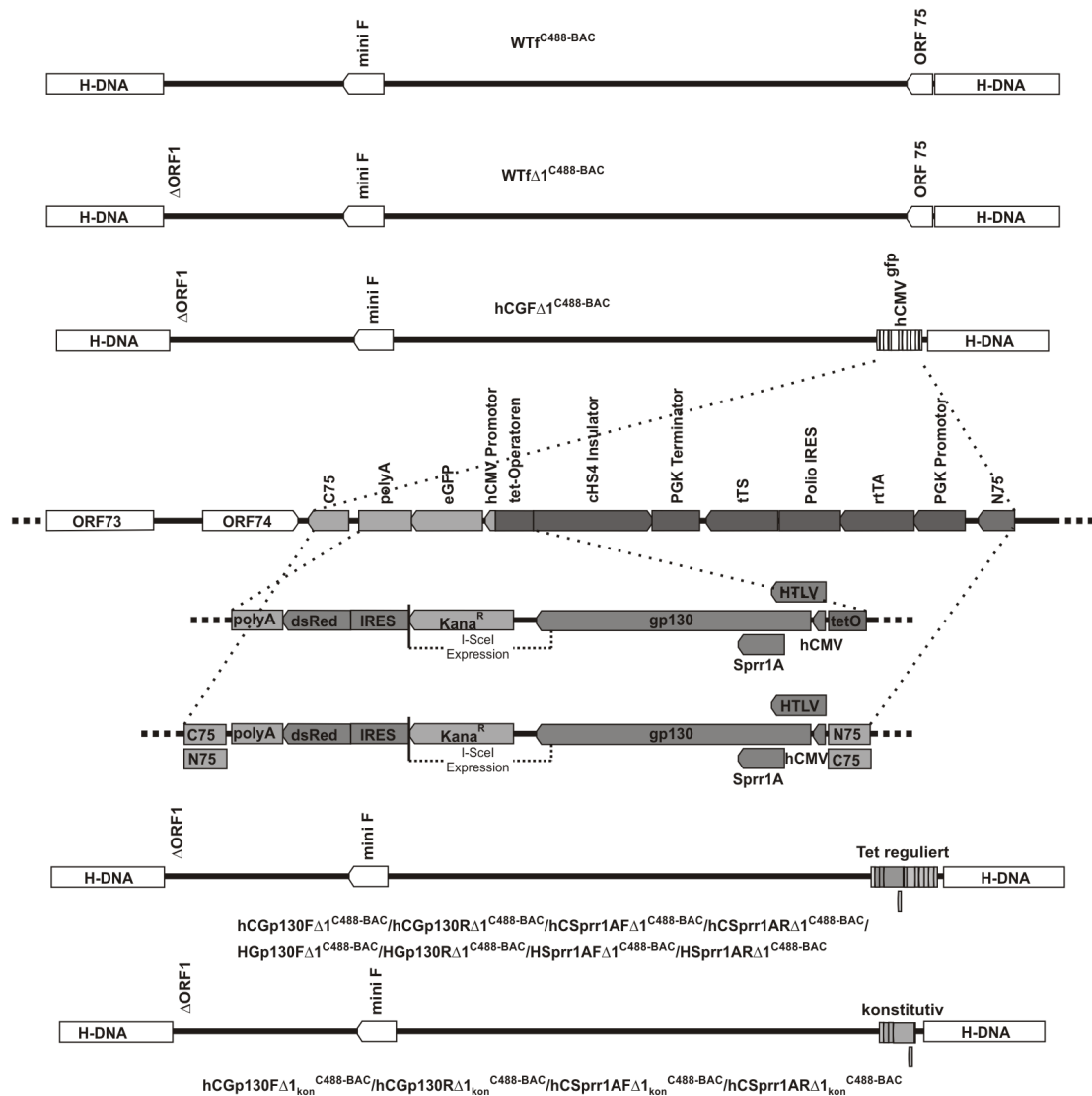


Abb. 4.35: Rekombinante WTf^{C488-BAC} mit gp130 bzw. Sprr1A und dsRed. Dargestellt ist die Insertion des bicistronischen Konstrukts aus murinem Glykoprotein 130 bzw. Sprr1A und dsRed in die bereits vorhandene Tet-regulatorische Transgenkassette in *ORF75*. Durch die Insertion wurde die Tet-regulatorische Kasse in einigen Konstrukten entfernt, wodurch die Expression von gp130 und dsRed konstitutiv wurde. Die Insertionen erfolgten sowohl in Konstrukte mit einer direkten als auch einer reversen Orientierung. ^{C488-BAC}: BAC; C75: C-Terminus von *ORF75*; chS4 Insulator: Hühner-β-Globin-Isolator; eGFP: verstärktes grün fluoreszierendes Protein; hCMV: humaner Cytomegalovirus-Promotor; HTLV: Fusionspromotor aus dem Promotor des humanen T-lymphotropen Virus Typ 1 und des Promotors für den Elongationsfaktor 1α; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle des Enzephalomyokarditis-Virus; Kana^R: Kanamycin-Resistenzkassette; N75: N-Terminus von *ORF75*; ORF: offener Leserahmen; PGK Promotor: Phosphoglyceratkinase-Promotor; PGK Terminator: Phosphoglyceratkinase-Terminator; Polio IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle des Poliovirus; polyA: polyA-Sequenz; Tet-Operator: Tetracyclin-Operator; rtTA: reverser Tet-abhängiger Transaktivator; tTS: Tet-abhängiger Transsilencer.

Die Rekombination in das Ausgangs-BAC [Abb. 4.35], das bereits eine Tet-regulatorische Kasette in *ORF75* trug und eine Deletion von *ORF1* aufwies, wurde durch RFLP-Analyse überprüft. Sowohl das hier entstandene Bandenmuster, als auch das Bandenmuster aus dem Verdau der isolierten viralen DNA nach der Rekonstitution zeigten das gewünschte Ergebnis [Abb. 4.36].

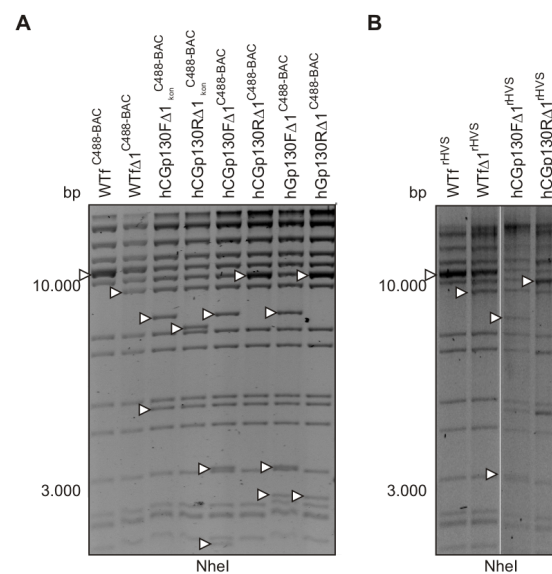


Abb. 4.36: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse von BAC- und Virus-DNA. Die Pfeilspitzen deuten auf die Unterschiede in den Bandenmustern hin. **A** Verdau der BAC-DNA mit NheI. **B** Verdau der Virus-DNA mit NheI. Invertierte Darstellung der Grauwerte. bp: Basenpaare.

Eine anschließende Kinetik der verschiedenen Viren zeigte, dass die rekombinanten Viren keinen Replikationsunterschied zum WT^{HVS} besitzen [Abb. 4.37].

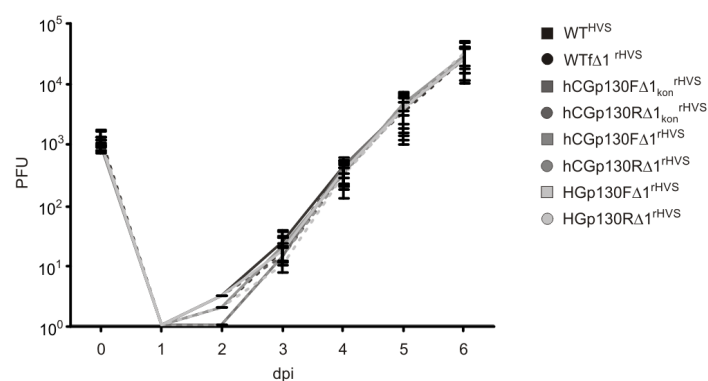


Abb. 4.37: Replikationskinetiken der rekonstituierten Viren. Gezeigt ist die Replikation der verschiedenen Viren über sechs Tage. dpi: Tage nach der Infektion; PFU: Plaque-bildende Einheiten.

4.4.2 Expressionskontrolle in OMK- und Hamsterzellen

Die Expression des bicistronischen dsRed wurde bei der Rekonstitution der Viren in permissiven OMK-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei zeigten die cytopathischen Effekte eine starke rote Fluoreszenz [Abb. 4.38].

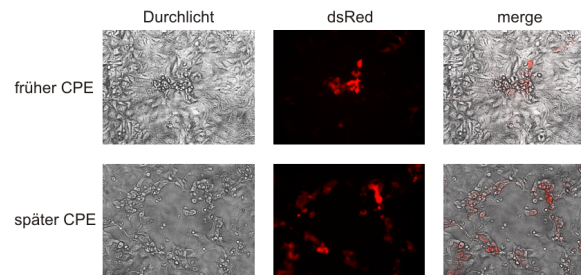


Abb. 4.38: Cytopathische Effekte. OMK-Zellen wurden mittels Lipofectamin mit BAC-DNA transfiziert (hCGp130F Δ 1^{C488-BAC}) und nach Bildung der ersten cytopathischen Effekte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Zum Vergleich der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Viren und zum Rückschluss auf die vermutliche Expression des Transgens gp130 wurden Ovarzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) mit Virusvektoren transduziert und nach einer Woche für 24 h mit Dox induziert. Die Auswertung erfolgte im Durchflusscytometer [Abb. 4.39]. Eine deutliche Anzahl an dsRed exprimierenden Zellen konnte nur in Kulturen festgestellt werden, die mit Vektoren transduziert worden waren, die den hCMV-Promotor in der Dox-induzierten Transgen-Variante besitzen. Die Expressionsstärke scheint orientierungsunabhängig zu sein (direkte Orientierung mit 22,4 % zu reverser Orientierung mit 20,0 %).

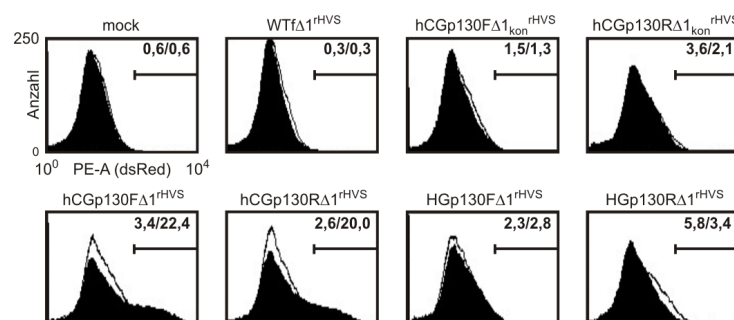


Abb. 4.39: Nachweis der dsRed-Expression in CHO-Zellen. Transduzierte CHO-Zellen wurden nach einer Woche für 24 h mit Dox induziert und im Durchflusscytometer vermessen. Im Vergleich sind die Zellen ohne Induktion (weißer Graph; erste Zahl) und mit Induktion (schwarzer Graph; zweite Zahl) dargestellt.

4.4.3 Funktionelle Expression von gp130 durch rhadinovirale Vektoren

Die Transkription (Daten nicht gezeigt) wurde durch RT-PCR und die Protein-Expression von gp130 wurde durch Westernblot mit anti-gp130-Antikörpern analysiert. Dazu wurden CHO-Zellen mit Virusvektoren transduziert und nach einer Woche für 24 h mit Dox induziert. Die Ergebnisse waren vergleichbar zu den Resultaten der Durchflusscytometrie [Abb. 4.40A]. Die Zellen, die mit den Tet-induzierbaren hCMV-Promotor-Vektoren hCGp130FΔ1^{rHVS} und hCGp130RΔ1^{rHVS} transduziert worden waren, zeigten die stärkste gp130-Expression. Der Vektor mit dem Konstrukt in reverser Orientierung schien jedoch mehr gp130 zu exprimieren als bei inverser Orientierung. Eine sehr schwache Bande bei 130 kDa war auch bei dem induzierbaren- HTLV-EF1α-Promotor-Virus in reverser Orientierung (HGp130FΔ1^{rHVS}) zu beobachten. Wegen der geringen Intensität wurden diese Vektoren für nachfolgende Versuche aber nicht eingesetzt.

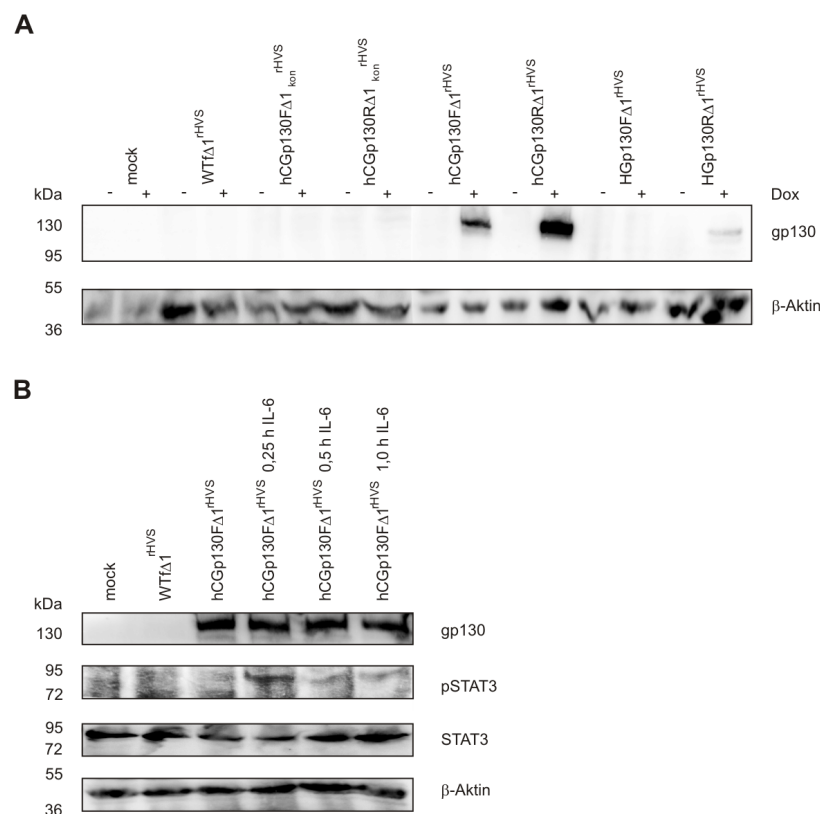


Abb. 4.40: Nachweis der Expression und Funktionalität des gp130. **A** CHO-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusvektoren transduziert und nach einer Woche mit Dox induziert. Nach der Zelllyse wurde im Westernblot die gp130-Expression nachgewiesen. **B** CHO-Zellen wurden mit dem Vektor hCGp130FΔ1^{rHVS} transduziert. Nach einer Woche wurden die Zellen mit Dox induziert und ein Teil für 0,25 h, 0,5 h und 1,0 h mit IL-6 inkubiert. Im Westernblot wurden die Lysate auf gp130, pSTAT3, STAT3 und β-Aktin hin untersucht.

Der Virusvektor hCGp130FΔ1^{rHVS} wurde zur Überprüfung der Funktionalität von gp130 verwendet [Abb. 4.40B]. gp130 reagiert auf einen IL-6-Stimulus mit verstärkter Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3). Die STAT3-Phosphorylierung wurde im Westernblot untersucht, nachdem die Dox-induzierten Zellen 15, 30 oder 60 min einer IL-6-Konzentration von 20 ng/ml ausgesetzt waren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Signalweiterleitung über pSTAT3 schnell anläuft und von den untersuchten Zeitpunkten schon nach 15 min die maximale Signalstärke erreicht. Danach sinkt die Signalstärke von pSTAT3 wieder. Die Expression von gp130 war bei den vier mit hCGp130FΔ1^{rHVS} transduzierten Proben vergleichbar stark und auch die STAT3- und β-Aktin-Kontrollen zeigten vergleichbare Expressionsmengen.

4.4.4 Transduktion sensorischer Neurone von gp130-Defekt-Mäusen

In Kooperation mit der Abteilung Physiologie an der Medizinischen Universität Innsbruck wurden murine sensorische Neuronen aus dorsalen Spinalganglien mit HVS-Vektoren transduziert. Diese Neuronen besitzen einen gp130-Defekt spezifisch in ihren Nozizeptoren [Andratsch et al., 2009]. Die Neuronen wurden quantitativ in Bezug auf die Neuriten tragenden Zellen und das Neuritenwachstum untersucht. Die quantitative Auswertung wurde auf die viral transduzierten Neuronen mit IL-6-Zugabe normalisiert.

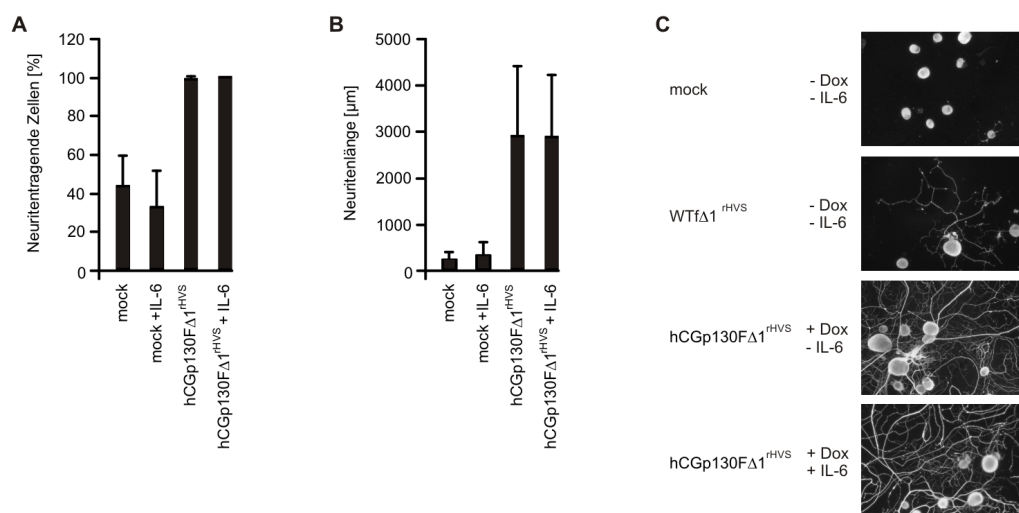


Abb. 4.41: Transduktion von gp130-defekten Mausneuronen. Mausneuronen wurden mit HVS-Vektoren transduziert und auf ihr Neuritenwachstum untersucht. Die Ergebnisse zeigten die Auswirkungen der gp130-Reexpression in Bezug auf die **A** Anzahl der Neuriten tragenden Zellen (auf transduzierte Neuronen normiert) und die **B** Neuritenlänge. **C** Mikroskopische Visualisierung der dsRed-Expression. Alle hier dargestellten Ergebnisse wurden in Kooperation mit Max Metzdorf und Dr. Serena Quarta (Abteilung Physiologie an der Medizinischen Universität Innsbruck) durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Transduktion mit gp130-exprimierenden HVS-Vektoren die Anzahl an Neuriten tragenden Zellen um ca. 56 % steigert [Abb. 4.41A]. Die zusätzliche Gabe von IL-6 hat keine Auswirkung, da gp130-exprimierende Neuronen IL-6 sezernieren. Die Neuriten waren nach Transduktion mit dem Virusvektor wesentlich länger als in den Kontrollproben. Das Neuritenwachstum war um mehr als das 12-fache gesteigert [Abb. 4.41B]. Zusätzlich wurden die Ergebnisse im Fluoreszenzmikroskop über die dsRed-Expression in den Neuronen visualisiert [Abb. 4.41C]. Die mit dem Wildtypvirus-transduzierten Neuronen zeigten im Vergleich zu den nicht-transduzierten Neuronen ein gering gesteigertes Neuritenwachstum. Die mit den gp130-tragenden Virusvektoren transduzierten Neuronen bildeten dagegen ein weit verzweigtes Neuritennetz aus.

HVS-Vektoren sind also in der Lage, murine Neuronen aus dorsalen Spinalganglien zu transduzieren und die (Re-)Expression gewünschter Proteinen zu ermöglichen. Die bicistronische Expression eines fluoreszenzierenden Proteins erleichterte die Unterscheidung zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Neuronen.

4.5 miRNA von Herpesvirus saimiri

Da in Vorversuchen HSUR2 als der optimale Kandidat für miRNAs des Virusstamms C488 erschien, wurde die HSUR2-Sequenz aus DNA-Proben unterschiedlicher HVS-Stämme verschiedener Subgruppen sequenziert [Tab. 4.3; Ensser et al., 2003].

Tab. 4.3: Sequenzierung von HSUR2 aus verschiedenen HVS-Stämmen. Die Stammbezeichnungen wurden aus einer Publikation übernommen [Ensser et al., 2003]. Aus den grau hinterlegten Sequenzen erfolgte die Vorhersage der Sekundärstruktur.

<i>Saimiri</i> <i>sciureus</i> No.	Stamm	Sequenz
5746	C	TAC TGTGCTCTCACTACTATAAACTTTGCTGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
5747	A+(C)	GAC TGTGCTCTCTGCACTATAAACTTTGCAGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
5753	C	TAG TGTGCTCTCAGTACTATAAACTTTGCTGCTGTTTTGAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
5945	C	TAC TGTGCTCTCACTACTATAAACTTTGCTGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
5947	C	TAC TGTGCTCTCACTACTATAAACTTTGCTGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
5952	C	TAC TGTGCTCTCACTACTATAAACTTTGCTGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
6045	B	TAG TGTGCTCTCAGTACTGTAACTTTGCTGCTGTTTTGAGTATATAGTGTGAGAG CAC
6051	A+(C)	GAC TGTGCTCTCAGCACTATAAACTTTGCAGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAG CAC
6661	(A)+C	TAC TGTGCTCTCACTACTATAAACTTTGCTGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAGC ACT
8907	C	GAC TGTGCTCTCAGCACTATAAACTTTGCAGTTTTTAGTATATAGTGTGAGAG CAC

Die Sequenzierung ermöglichte das Design geeigneter Oligonukleotide für die Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR. Außerdem wurde auf der Grundlage der Sequenzierungen durch Prof. Grundhoff (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) die wahrscheinlichste HSUR2-Struktur vorhergesagt [Abb. 4.42].

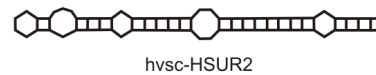


Abb. 4.42: HSUR2 von HVS C488. Vorhersage der Sekundärstruktur der HSUR2-pre-miRNA von HVS (Prof. Grundhoff, Hamburg).

Bei den folgenden Experimenten erfolgten die Kultivierung der T-Lymphozyten von Menschen und Affen, die Infektionen der OMK-Zellen mit HVS C488 oder A11, die RNA-Isolierungen aus den genannten Zellen, die Aufreinigung der miRNAs aus diesen Proben und ein Teil der quantitativen RT-PCRs durch mich, während die anderen Versuche im Rahmen unserer Zusammenarbeit durch die Arbeitsgruppe Grundhoff in Hamburg durchgeführt wurden (jeweils konkret angegeben).

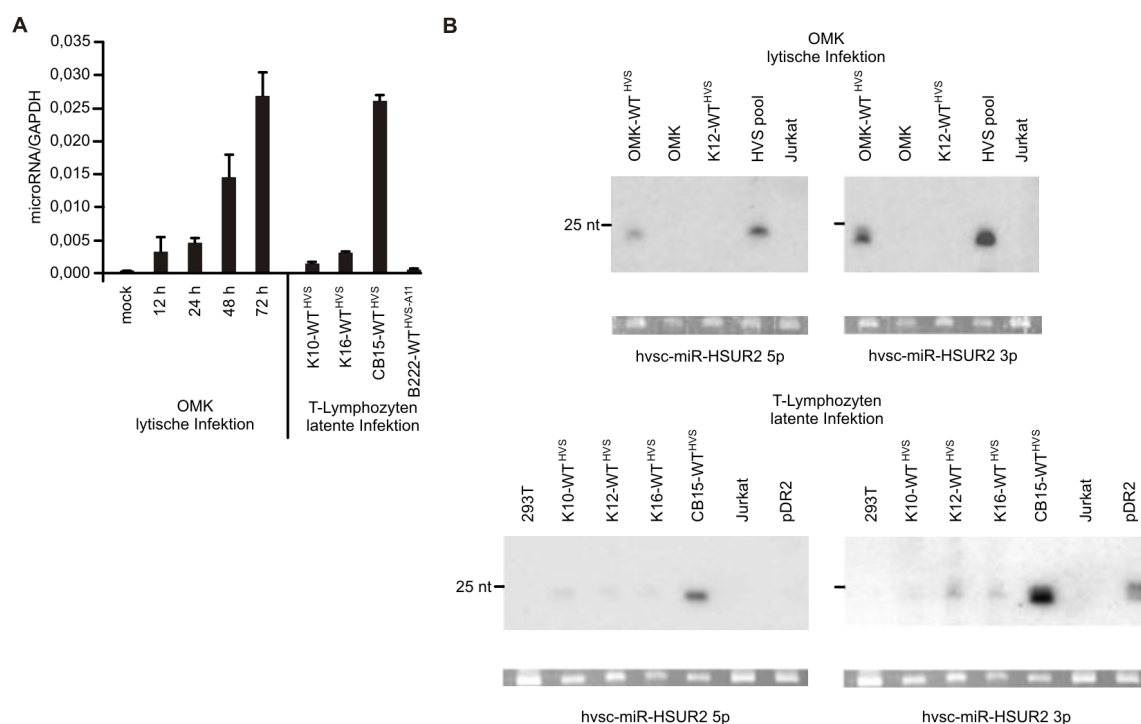


Abb. 4.43: Nachweis von HVS-miRNA. Bei latent und lytisch infizierten Zellen erfolgte der Nachweis der miRNA hvsc-HSUR2 über Sonden in einer **A** quantitativen Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR und im **B** Northernblot. Die Sonden richteten sich gegen **A**, **B** 5p oder **B** 3p von hvsc-HSUR2. nt: Nukleotide. Ergebnisse der Northernblots in Kooperation mit Dr. Nicole Walz (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg).

Der Nachweis des 5p-Arms der HSUR2 von HVS C488 in den RNA-Proben erfolgte zuerst mit einer Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR. Lytisch infizierte OMK-Zellen wurden 12, 24, 48 und 72 h nach der Infektion geerntet und die RNA wurde daraus isoliert. Für den HSUR2-Nachweis in latent infizierten Zellen wurde die RNA HVS-tranduzierter T-Lymphozyten von Menschen und Affen analysiert [Abb. 4.43A]. Die Anzahl der gefundenen Transkripte wurde auf das zelluläre Transkript von GAPDH normiert. Der Anteil an HSUR2-5p nahm über die Zeit in den OMK-Zellen zu. In den latent tranduzierten T-Lymphozyten zeigte sich ein variables Bild. Die Kulturen der humanen Lymphozyten K10 und K16 zeigten nur eine geringe miRNA-Menge, während sich in CB15 viel HSUR2-5p befand. Die Affen-T-Lymphozyten B222, die mit der Untergruppe A11 von HVS infiziert waren, zeigten eine geringe hvscHSUR2-5p-Transkription. Die Sonden für den 3p-Arm zeigten in der Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR nur unspezifische Signale.

Am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg erfolgte im Northernblot mit 32P-markierten Sonden der Nachweis des 5p- und 3p-Arms der HSUR2 [Abb. 4.43B]. Die lytisch infizierten OMK-Zellen zeigten sowohl eine Bande für den 5p-Arm als auch mit der 3p-Arm-Sonde knapp unterhalb von 25 Nukleotiden. Als Positivkontrolle diente hier ein Gemisch vorher positiv getesteter RNA-Proben (HVS pool). Für die latent tranduzierten humanen T-Lymphozyten konnten nur sehr schwache Banden für den 5p-Arm und 3p-Arm der HSUR2 nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die humane Zelllinie CB15 eine starke Bande unterhalb von 25 Nukleotiden.

Tab. 4.4: Detektion der viralen miRNA. Mit verschiedenen Methoden (quantitative Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR, Northernblot und NGS) und Protokollen (Truseq, NEB, RandomProt) wurden die unterschiedlichen RNA-Proben analysiert.

Methode	OMK	T-Zellen	293
quantitative Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR	A11 und C488	A11 und C488	A11 und C488
Northernblot	C488	C488	
Kiel NGS, Truseq	C488	C488	
HPI NGS, Truseq	A11		A11 und C488
HPI NGS, NEB	A11 und C488	C488	
HPI NGS, RandomProt	C488	C488	

Zusätzlich zu den oben dargestellten Ansätzen wurden sowohl OMK-Zellen mit HVS-A11 über verschiedene Zeitspannen infiziert, als auch 293-Zellen mit HSUR2-tragenden Plasmiden von C488 oder A11 transfiziert. HVS-A11 diente dem Abgleich der Ergebnisse mit einer parallelen Veröffentlichung [Cazalla et al., 2011]. Aus allen Proben wurde die RNA gewonnen und analysiert. Neben dem Nachweis durch quantitative Stammschleifen-Echtzeit-RT-PCR und

Northernblot wurden verschiedene Protokolle (Truseq, NEB, RandomProt) des *next generation sequencing* (NGS) in Kiel und Hamburg durchgeführt [Tab. 4.4]. Die Detektion der miRNA HSUR2 von HVS C488 war in allen Proben erfolgreich.

Aus diesen unterschiedlichen Ansätzen wurden die jeweils fünf häufigsten zellulären miRNAs gesucht [Tab. 4.5]. Besonders häufig wurde dabei die zelluläre miR-155 gefunden. Aber auch die miRNAs miR-21 (4x) und Let-7 (3x) sind mehrfach vertreten.

Die Ergebnisse belegen, dass die HSUR2 von HVS in verschiedenen latent oder lytisch infizierten Zellen nachgewiesen werden können. Der Nachweis regulierter zellulärer miRNAs deutet auf einen konservierten Mechanismus hin, durch den die Expression der zellulären miRNA-155 hochreguliert wird.

Tab. 4.5: Regulation zellulärer miRNAs durch HVS. Die Regulation zellulärer miRNAs durch HVS wurde untersucht und die fünf häufigsten miRNAs jeder Probe wurden aufgelistet. NEB und HPI sind verschiedene Methoden des NGS.

Zellen	Virus		Methode	
293	C488 transfiziert	A11 transfiziert	Truseq	
	miR-100	miR-100		
	miR-192	miR-192		
	miR-21	miR-21		
	HVS	miR-30a		
	miR-30	miR-10a		
T-Zellen	C488 infiziert: NEB	C488 infiziert: HPI	NGS	
	miR-21	miR-21		
	HVS	HVS		
	miR-146	miR-155		
	Let-7	miR-142		
	miR-155	Let-7		
OMK	C488 infiziert: NEB	C488 infiziert: HPI	A11 infiziert: NEB	NGS
	miR-155	miR-155	miR-21	
	miR-21	HVS	Let-7	
	miR-146	miR-30d	miR-100	
	Let-7	miR-99b	miR-30	
	miR-100	miR-192	miR-192	
			miR-155 (Pos. 8)	

4.6 Pyrosequenzierung des Virusvektors mit mini-F-Fragment

Die genomische Pyrosequenzierung des HVS-BAC-Vektors erfolgte am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Dr. Georg Hemmrich-Stanisak). Der Vergleich mit der zuvor bekannten Sequenz aus genomischen Subklonen [Ensser et al., 2003] ergab eine vollständige Übereinstimmung mit Ausnahme von zwei Punktmutationen, die beide einen Aminosäureaustausch zur Folge haben [Tab. 4.6].

Tab. 4.6: Pyrosequenzierung von HVS. Die Punktmutationen zur bekannten HVS-Sequenz und ihre Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz wurden dargestellt.

Position	Punktmutation	AS-Wechsel	Protein (<i>ORF</i>)
90.369 bp	C → T	Asp → Asn	DNA-Glykosylase (<i>ORF46</i>)
90.807 bp	G → A	Ala → Val	Glykoprotein L (<i>ORF47</i>)

An Position 90.369 in *ORF46* wurde ein Thymin statt eines Cytosins detektiert. Dieser Wechsel führt zu einem Austausch der Asparaginsäure zum Asparagin und somit zu einem Wechsel einer polaren Aminosäure gegen eine saure Aminosäure. Die Struktur von beiden Aminosäuren ist jedoch ähnlich. An Position 90.807 in *ORF47* wurde eine Punktmutation von Guanin zu Adenin nachgewiesen. Die Aminosäure Alanin wird hier gegen Valin ausgetauscht. Diese Aminosäuren sind beide polar und in ihrer Struktur sehr ähnlich. Die Pyrosequenzierung von HVS BAC C488 hat gezeigt, dass die weiteren Klonierungsschritte keine wesentlichen Veränderungen der Sequenz verursacht haben und die bekannte Sequenz weiterhin weitestgehend korrekt ist.

5 Diskussion

5.1 Umleitung der T-Zell-Spezifität auf ein Tumorantigen durch rhadinovirale Vektoren

Optimale Vektorkonfiguration für T-Zellen

Für die Umleitung der T-Zell-Spezifität durch rhadinovirale Vektoren wurde ein cTCR der ersten Generation gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor ErbB2 eingesetzt, dessen Funktionalität aus umfangreichen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten bereits dokumentiert vorlag [Wels et al., 1992; Eshhar et al., 1993; Moritz et al., 1994; Wels et al., 1995; Altenschmidt et al., 1996; Altenschmidt et al., 1997; Maurer-Gebhard et al., 1998; Schmidt et al., 2001; von Minckwitz et al., 2005]. Der Leserahmen für den cTCR wurde vergleichend an zwei verschiedenen Positionen in das HVS-Genom mittels *En passant*-Mutagenese eingefügt. Dadurch entstand einerseits ein tricistronisches Konstrukt aus cTCR und der Transkriptionseinheit der viralen Gene *stpC* und *tip* (scfr-IRES^{HVS}) sowie andererseits ein separat exprimierter cTCR (scfrULT^{HVS}). Bei dem separat exprimierten Konstrukt konnte über den Zeitraum von zwölf Monaten zwar eine Transkription des cTCRs festgestellt werden. Im Westernblot war das Protein jedoch nicht detektierbar. Zwar konnten für die separate Konfiguration in der Immunfluoreszenz (Daten nicht gezeigt) Hinweise gewonnen werden, dass auch hier der cTCR auf der Oberfläche der transduzierten T-Lymphozyten mit geringer Intensität nachweisbar war; im BATDA-Cytotoxizitätstest war aber keine spezifische Lyse der Tumorzellen festzustellen. Die im Cytotoxizitätstest gewonnenen Werte lagen bei oder unter den Werten der T-Zellen, die mit dem Wildtypvirus (WT^{rHVS}) transduziert worden waren. Deshalb wurde das separate Konstrukt nicht weiter verfolgt und der weitere Fokus dieser Arbeit auf das tricistronische Konstrukt gelegt. Die Gene *stpC* und *tip*, mit denen sich der cTCR in einer einzigen Transkriptionseinheit befindet, sind für die Transformation der humanen T-Lymphozyten zu stabilem Wachstum notwendig und werden während der gesamten Zeit von den T-Zellen exprimiert [Fickenscher et al., 1996]. Da sich der cTCR ebenfalls unter der Regulation des Promotors dieses bicistronischen Gens befand, war die stabile cTCR-Expression gewährleistet. Außerdem konnte diese Eigenschaft als positiver Selektionsdruck verwendet werden, ohne die Notwendigkeit weiterer Antibiotika. Nach der Infektion mit den viralen Vektoren WT^{rHVS} und scfr-IRES^{HVS}

und der anschließenden Transformation von T-Lymphozyten dreier unterschiedlicher menschlicher Spender wurde der Oberflächen-Phänotyp der T-Zellen im Durchflusscytometer analysiert [Abb. 4.4]. Dabei zeigte sich, dass alle erhaltenen T-Lymphozyten-Linien homogene CD8⁺-CD3⁺-Populationen waren und somit die Ergebnisse der unterschiedlichen Transduktions- und Transformationsexperimente direkt vergleichbar waren.

Langfristige ErbB2-spezifische Cytotoxizität

Die Kontrolle der langfristigen cTCR-Expression bildete die Basis für die weiteren Experimente. Der Nachweis der Transkription [Abb. 4.5] und Translation [Abb. 4.6] des tricistronischen Konstrukts in den T-Lymphozyten von drei Spendern gelang über einen Zeitraum von zwölf Monaten. Eine stabile Expression eines derartigen Transgens von einem viralen Vektor über einen so langen Zeitraum war bisher nicht beschrieben und bietet somit erstmals die geeigneten Voraussetzungen, die Wirkungen und Nebenwirkungen des Transgens in geeigneten Versuchsansätzen im Detail zu testen, bevor die transduzierten Zellen z.B. in einem gentherapeutischen Ansatz Verwendung fänden.

Durch die Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper in der Immunfluoreszenz konnten cTCR-Moleküle auf der Oberfläche transduzierter T-Lymphozyten detektiert werden [Abb. 4.7]. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel auf, dass die T-Lymphozyten, die mit dem scfr-IRES^{rHVS} transduziert worden waren, kleiner waren und ihr Zellkern weitestgehend das komplette Cytoplasma ausfüllte. In der Literatur ist beschrieben, dass aktivierte T-Zellen einen vergrößerten Zellkern besitzen, da sich für die beginnende Transkription der Transkriptionsfaktoren der Anteil an Euchromatin vergrößert [Jeong et al., 2009]. Dieses kann als ein Hinweis gedeutet werden, dass diese Zellen eine besonders gute Viabilität und einen hohen Aktivierungsgrad haben. Für den BLT-Test wurde die Granulafreisetzung der T-Zellen im Normalzustand ohne Kontrakt mit Tumorzellen bestimmt. Diese basale Granulafreisetzung ist bei den T-Lymphozyten mit dem scfr-IRES^{rHVS} niedriger als bei den WT^{rHVS}-T-Zellen. Eine Verringerung des Cytoplasma-Volumens durch erhöhten Granulaaustritt kann somit ausgeschlossen werden.

Die Funktionalität der cTCR wurde mit Hilfe der ErbB2-positiven Standard-Tumorzelle MDA-MB453 zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3, 6, 9 und 12 mpi) getestet [Abb. 4.8]. Je länger sich die Zellen im transformierten Zustand befanden, desto signifikanter (zweiseitiger zweiparametrischer T-Test [Tab.: 4.1]) wurden die Unterschiede zwischen den WT^{rHVS}- und scfr-IRES^{rHVS}-T-Lymphozyten. Die erhöhte lytische Kapazität kann somit eindeutig auf die lang-

fristige, stabile Expression des cTCRs gegen ErbB2 zurückgeführt werden.

Zur direkten Visualisierung der Cytotoxizität wurde die Tumorzelllinie MDA-MB453 mit dem Acetoxymethylester Calcein-AM markiert, der über die Zellmembran diffundieren kann, und die Abnahme der Fluoreszenz in Gegenwart der T-Lymphozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet [Abb. 4.15]. Tumorzellen, die ohne T-Zellen oder mit den WT^{rHVS}-transformierten T-Lymphozyten inkubiert wurden, zeigten eine vergleichsweise schwache Abnahme ihrer Fluoreszenzstärke. Diese schwache Abnahme lässt sich durch das Ausbleichen (*photobleaching*) des Calceins erklären, dass durch die zeitlich getakteten Fotoaufnahmen zustande kommt. Dagegen zeigten Tumorzellen nach etwa 3 h Inkubation mit cTCR-exprimierenden T-Zellen infolge der Zelllyse eine vollständige Fluoreszenzabnahme, die der effizienten Cytotoxizität entsprach.

Die beobachtete Lyse wird durch den Kontakt des cTCR auf der Oberfläche der T-Lymphozyten mit den ErbB2-Rezeptoren auf den humanen Tumorzellen, ebenso wie auf primären Tumor-Zellkulturen eingeleitet. Durch die räumliche Nähe werden die T-Lymphozyten zu einer erhöhten Fusion von intrazellulären Granula mit ihrer Zellmembran angeregt. Die neutrale Serinprotease Granzym B wird zusammen mit dem cytolytischen Protein Perforin aus den Granula in den extrazellulären Raum abgegeben. Perforin bildet eine Pore in der Zielzell-Membran, durch die Granzym B in die Zelle eindringen kann. Granzym B verursacht in der Zielzelle auf unterschiedliche Weise den Zelltod. In der Literatur sind diverse Zielproteine von Granzym B beschrieben, wie z.B. Bid, PARP, Caspase 3, Caspase 7, Caspase 8 und Lamin [Sutton et al., 2000; Bots und Medema, 2006]. Durch die Spaltung von Bid wird in der Folge die Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien eingeleitet. Außerdem wurde ein Caspase-abhängiger Zelltod durch die Spaltung der Pro-Caspase 3 durch Granzym B beschrieben [Sutton et al., 2003]. Die gesteigerte Fusion der Granula in den T-Lymphozyten mit der Zellmembran wurde mit Hilfe des BLT-Test untersucht. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Granulafreisetzung bei den cTCR-exprimierenden T-Lymphozyten im Vergleich zu den WT^{rHVS}-transformierten T-Zellen. Diese Steigerung war bei ErbB2-tragenden Tumorzellen wesentlich größer als bei der ErbB2-negativen Tumorzelllinie MDA-MB468. Diese Beobachtung dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die ErbB2-tragenden Tumorzellen eine wesentlich stärkere Stimulation der T-Lymphozyten durch die Bindung des cTCR an ErbB2 auslösen. Durch Zugabe des Inhibitors Concanamycin A konnte die Tumorzell-Lyse durch cTCR-exprimierende T-Zellen im BATDA-Cytotoxizitätstest blockiert werden. Concanamycin

A ist als ein Inhibitor der perforinabhängigen Lyse bekannt [Kataoka et al., 1996]. Somit sind an der beobachteten Cytotoxizität offensichtlich Granzym B und Perforin beteiligt.

Zielzell-Spektrum für die cTCR-exprimierenden T-Lymphozyten

Nach den zwölfmonatigen Vorversuchen wurden die Experimente zur Induktion der Lyse auf weitere Tumorzell-Typen ausgeweitet. Dazu wurden Tumorzelllinien und primäre Tumorzellkulturen zunächst auf ihre ErbB2-Expression im Durchfluscytometer [Abb. 4.10] und Westernblot [Abb. 4.12] untersucht. Dabei zeigten sich stark unterschiedliche Expressionsstärken bei den verschiedenen Zelllinien. Die humane Tumorzelllinie MDA-MB468 zeigte auch hier keine ErbB2-Expression und diente deshalb als Negativkontrolle. Die stärkste ErbB2-Expression wurde in der humanen ovariellen Tumorzelllinie SKOV3 gemessen. Im Gegensatz zu den stabil immortalisierten Zelllinien zeigte die primäre Tumorzellkultur ZG17 eine nur sehr geringe ErbB2-Expression. Die Subpopulationen der primären Zellkulturen zeigten sowohl eine höhere Proliferationsrate als die primäre Zellkultur als auch eine ausgeprägtere ErbB2-Expression.

Zusätzlich wurden murine Zelllinien getestet, in die ErbB2 stabil transfiziert worden war. Die ErbB2-Expression war in den murinen Zellen zwar vorhanden, aber im anschließenden BATDA-Cytotoxizitätstest zeigten sie keine reproduzierbaren Ergebnisse, sodass die Versuche mit murinen Zelllinien nicht fortgeführt wurden. Die variablen Lyseraten der murinen ErbB2-positiven Zellen könnten auf eine xenogene Aktivierung der humanen cytotoxischen T-Lymphozyten zurückzuführen sein. Dagegen schien die ErbB2-spezifische Reaktion nicht ausgeprägt zu sein, was für eine Beteiligung human-spezifischer kostimulatorischer Moleküle sprechen könnte.

Anhand der Ergebnisse der ErbB2-Expressionsanalyse, der Fähigkeit der Zellen, sich mit dem Chelator BATDA markieren zu lassen [Abb. 4.11] und der Ergebnisse der wiederholten BATDA-Cytotoxizitätstests wurden neun verschiedene Zellkulturen für weiterführende Experimente ausgewählt, zu denen vier stabile Zelllinien, vier Subpopulationen und eine primäre Zellkultur zählten. Die Lyse der ausgewählten Zellkulturen durch die transformierten T-Lymphozyten konnte im BATDA-Cytotoxizitätstest reproduzierbar nachgewiesen werden [Abb. 4.13]. In einem zweiten Testsystem, dem Laktatdehydrogenase-Test wurden die gewonnenen Ergebnisse konsistent bestätigt [Abb. 4.14], wenn auch der prozentuale Wert der Lyse innerhalb einer Zelllinie schwankte. Die Subpopulation KL5 zeigte im BATDA-Cytotoxizitätstest z.B. eine höhere prozentuale Lyse als im Laktatdehydrogenase-Test. Eine strikte Korrelation zwischen ErbB2-Expressionsstärke im Westernblot und prozentualer spezifischer Lyse war jedoch nicht erkennbar. Die Zelllinie SKOV3, die im Durchfluscytometer und im Westernblot

die stärkste ErbB2-Expression aufwies, zeigte z.B. keine stärkere Lyseinduktion als die primäre Zellkultur ZG17. Hier könnte intrazelluläres ErbB2 eine Rolle spielen, das vom cTCR auf T-Zellen nicht erkannt werden kann.

Cytotoxische Kapazität transduzierter CD4⁺ Zellen

Eine schwache Hintergrundlyse der humanen Tumorzellen konnte auch bei T-Lymphozyten beobachten werden, die durch den HVS-Wildtyp (WT^{rHVS}) transformiert waren. Im Zellkulturversuch wird durch die Verwendung von Rundbodenplatten eine besonders enge räumliche Nähe von T-Zellen und Tumorzellen hervorgerufen. Diese räumliche Nähe führt infolge einer CD2-LFA3-Interaktion zu einer Grundaktivierung der transformierten T-Lymphozyten und in dessen Folge zu einer höheren Granulafreisetzung der T-Lymphozyten [Mittrücker et al., 1992]. Zur Reduktion dieser Grundaktivierung wurde untersucht, ob CD4⁺-Helferzellen möglicherweise eine gezielte Cytotoxizität bei vermindertem Hintergrund aufweisen könnten. Dazu wurden HVS-transformierte CD4⁺-T-Helferzellen durch negative magnetische Sortierung generiert. Nach vier Monaten Kultivierung lagen reine CD4⁺-T-Zell-Populationen vor. Im Vergleich zu CD8⁺-T-Lymphozyten desselben Spenders konnten die CD4⁺-T-Lymphozyten aber keine spezifische Lyse bei den humanen ErbB2-positiven Tumorzelllinien induzieren. Dies entspricht der Beobachtung, dass die Serinprotease Granzym B nur in cytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird [Bots und Medema, 2006].

Rhadinovirales Vektorsystem und adoptive T-Zell-Therapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei HVS um einen aussichtsreichen Vektor für den Gentransfer und ggf. für die Gentherapie handelt. HVS-Vektoren weisen weitere Eigenschaften auf, die sie für die Gentherapie interessant machen. Dazu gehören die Möglichkeit, große Fragmente und somit umfangreiche Transgene zu inserieren, sich nicht teilende Zellen zu transduzieren und die latente episomale Persistenz ohne chromosomale Integration.

Bisher ist für HVS keine Onkogenität beim Menschen beschrieben. Bestimmte Spezies von Neuwelt-Primaten reagieren höchst empfindlich mit der Entstehung von T-Zell-Leukämien [Fleckenstein und Desrosiers, 1982]. Ihre T-Zellen sind semipermissiv, d.h. sie werden transformiert und produzieren gleichzeitig erhebliche Mengen an Virionen. Bei Makaken, den einzigen untersuchten Altwelt-Primaten, ist die Permissivität der transformierten T-Zellen sehr stark reduziert, ebenso wie die Neigung zur Entwicklung von T-Zell-Lymphomen [Fleckenstein und Desrosiers, 1982; Knappe et al., 2000; Rosenwirth et al., 2011]. Bei menschlichen T-Zellen liegt nach der Transformation keine Permissivität vor, so dass eine Freisetzung replikationskompe-

tenter Viren unwahrscheinlich ist [Biesinger et al., 1992]. Deshalb wäre nach einer autologen Transfusion ErbB2-reaktiver T-Zellen keine wesentliche Immunreaktion auf virale Strukturproteine zu erwarten, weil sie nicht exprimiert werden. Dies wurde im Makakenmodell tatsächlich so beobachtet, obwohl die Permissivität weniger strikt kontrolliert ist als bei humanen Zellen [Knappe et al., 2000].

Durch ihre Fähigkeit, humane T-Lymphozyten zu stabilem Wachstum zu transformieren, könnten HVS-Vektoren im adoptiven T-Zell-Transfer zum Einsatz kommen. Dieses Verfahren beruht auf der Entnahme von T-Lymphozyten eines Patienten, die im Labor verändert und vermehrt werden und danach wieder in den Patienten zu übertragen werden. Derartige primäre T-Zellen können nach ihrer Isolation in Gegenwart von Tumorantigenen spezifisch amplifiziert werden [June, 2007]. Da es sich um körpereigene, autologe Zellen handelt, ist die Immunreaktion des Patienten bei der Rückführung der T-Zellen reduziert. Eine zusätzliche Möglichkeit besteht jedoch darin, die Zellen wie in dieser Arbeit durch das Einbringen eines cTCR gegen Tumormarker gerichtet zu verändern. Die hier gezeigte langfristige Expression des cTCR nach Langzeit-Kultur sowie auch nach längerer Lagerung der Zellen bei -80°C ermöglicht einen wiederholbaren Einsatz der transformierten T-Lymphozyten im Patienten.

Zur Übertragung der cTCR-Gene in die Ziel-T-Zellen wurden meistens retrovirale oder lentivirale Vektoren verwendet. Diese Vektoren integrieren jedoch ins Wirtsgenom, was eine Insertionsmutagenese und Onkogenaktivierung zur Folge haben kann [Li et al., 2002]. Einige γ -retrovirale Vektoren zeigten im Versuch keine Genotoxizität, so dass bisher über 200 Patienten diese Art des Gentransfers erhalten haben. Die retroviral transduzierten T-Lymphozyten erhielten ihre Genexpressionsprofile, Cytokinreaktionen und TCR-Vielfalt *in vivo*, ohne das T-Zell-Repertoire einzuschränken oder eine Immortalisierung infolge der Integration auszubilden [Recchia et al., 2006; Bonini et al., 2006; Traversari et al., 2007; Maher, 2012]. Dagegen wurde aber in einer Gentransferstudie zur Korrektur des Defekts der common gamma chain mehrere T-Zell-Tumoren beobachtet, was die Verwendung retroviraler Tumoren bei Neugeborenen und Kleinkindern stark einschränkt [Hacein-Bey-Abina et al., 2010]. Diese Insertionsmutagenese ist bei rhadinoviralen Vektoren aufgrund ihrer episomalen Persistenz nicht zu erwarten.

cTCR in der adoptiven Immuntherapie

cTCRs haben entscheidende Vorteile gegenüber MHC-abhängigen autologen Strategien zur Tumorthherapie. So kann derselbe cTCR-basierende Ansatz unter allogenen Bedingungen bei verschiedenen Patienten weitgehend unabhängig von ihrer individuellen MHC-Ausstattung

verwendet werden, solange der Tumor das Zielgen exprimiert. Außerdem können Tumorzellen der Immunantwort durch Blockade der Antigenprozessierung und -präsentation entgehen. Dieser Mechanismus ist gegenüber cTCR-tragenden T-Zellen nicht wirksam. Durch die nach der Transformation beibehaltenen stabilen Eigenschaften der T-Lymphozyten besteht so die Möglichkeit, cTCR-tragende T-Zellen über den Blutstrom bis in die peripheren Tumoren zu transportieren und dort die Tumorzellen abzutöten. Bei einer autologen Transfusion wäre allerdings eine allogene Immunreaktion zu vermeiden. Andererseits erkennt aber der cTCR sein Antigen in einer MHC-unabhängigen Weise, so dass eine kurzfristige Therapie auch unter allogenen Bedingungen realistisch erscheint. Hier wäre die Therapiezeit vermutlich strikt begrenzt und die Elimination der therapeutischen Zellen zuverlässig zu erreichen. Bestimmte MHC-Konstellationen würden es aber auch ermöglichen, dass allogene therapeutische T-Zell-Linien bei einem hohen Prozentsatz von Patienten bei weitgehender Kompatibilität einsetzbar wären. Ein weiterer wesentlicher Vorteil wäre die Möglichkeit, die cTCR auch gegen weitere Makromoleküle zu richten. Hierbei wären z.B. TAG72, ein tumorassoziiertes Glykoprotein, und GD3, ein Gangliosid der Haut, von Interesse [Hombach et al., 1997; Yun et al., 2000].

Für einen klinischen Versuch wären cTCR der zweiten und dritten Generation vorteilhaft, da Versuche zeigten, dass Zellen mit cTCR der zweiten Generation nach der Infusion in den Patienten längere Überlebenszeiten besitzen [Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011; Savoldo et al., 2011]. Außerdem könnten vor der adoptiven Immuntherapie die körpereigenen Lymphozyten vernichtet werden, damit sie nicht mit den übertragenen Zellen konkurrieren können [Dudley et al., 2002; Pegram et al., 2012]. Allerdings wäre dieser eher radikale Weg vermutlich mit erheblichen Komplikationen einer sehr starken Immunsuppression im Sinne opportunistischer Infektionen behaftet. Weitere Möglichkeiten sind die gleichzeitige Gabe von cTCR-Transgenen auf virusspezifischen T-Lymphozyten [Murphy et al., 2007; Pule et al., 2008; Full et al., 2010; Terakura et al., 2012] oder Cytokinen besonders IL-2 [Till et al., 2008], aber nur in niedrigen Dosen [Lotze et al., 2012]. In einer *in vivo*-Anwendung wurde gezeigt, dass die cTCR-tragenden Zellen nicht immer problemlos zum Tumor transportiert werden [Parente-Pereira et al., 2011]. Deshalb wurden weitere Strategien entwickelt, die Wanderung der T-Lymphozyten durch chemotaktische Moleküle zu verbessern [Kershaw et al., 2002; Moon et al., 2011].

Zur Vermeidung einer *graft-versus-host*-Reaktion und der damit verbundenen akuten und chronischen Toxizität wurde der Einbau von Suizidgenen wie z.B. der Thymidinkinase von HSV-1 in die viralen Vektoren untersucht [Hiller et al., 2000]. Weitere Möglichkeiten sind die Ver-

wendung einer induzierbaren Caspase 9 [Straathof et al., 2005] zur gezielten Induktion der Apoptose, oder die Expression von CD20, das durch einen CD20-abbauenden Antikörper wie Rituximab erkannt werden kann. In dieser Arbeit wurde daher zusätzlich untersucht, ob durch die regulierte Expression von tBid oder reverse Caspase 3 [Abschnitt 4.3] eine gezielte Elimination transduzierter Zielzellen erreicht werden kann. Allerdings konnte noch keine ausreichend langfristige Expression zusätzlicher Transgene in HVS-transformierten T-Zellen erreicht werden.

In präklinischen Studien mit ErbB2-spezifischen murinen cTCR-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass HER2-exprimierende benigne Zellen im Gehirn und in der Mamma nicht erkannt wurden, aber dennoch ein ErbB2-positiver Tumor durch die cTCR-T-Lymphozyten angegriffen werden konnte [Wang et al., 2010]. Die adoptive autologe Immuntherapie mit cTCR-exprimierenden T-Zellen war im Fall eines Mädchens erfolgreich, das an Akuter Lymphatischer Leukämie litt und bei dem eine Chemotherapie keine Erfolge erzielt hatte. Hier wurden primäre autologe T-Lymphocyten mit von HIV abgeleiteten lentiviralen Vektoren für einen gegen CD19 gerichteten cTCR (CART19) transduziert. Diese T-Zellen richteten sich gegen die Tumor-B-Zellen und zerstörten diese, so dass es zu einer Remission kam [Porter et al., 2011].

Der Einzelkettenantikörper scFv-(FRP5)

Schon Paul Ehrlich suchte nach Varianten bakterieller Toxine, die im Organismus eine gezielte Wirkung ausüben, ohne den Körper zu schädigen. Diese Wirkstoffe nannte er Zauberkuugeln (*magic bullets*). Der ErbB2-spezifische Antikörper scFv-(FRP5) für den hier verwendeten cTCR leitet sich aus einem monoklonalen Antikörper ab, der detailliert untersucht wurde [Harwerth et al., 1992; Harwerth et al., 1993]. Zusätzlich wurde dieser scFv-Antikörper auch zu einem rekombinanten Einzelkettenantikörper-Toxin entwickelt [Wels et al., 1992]. Das dort verwendete rekombinante Toxin wurde bereits *in vitro*, im Tiermodell und in einer klinischen Studie Phase I getestet. Eine antitumorale Aktivität konnte gegen primäre Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien gezeigt werden [Wels et al., 1992; Spyridonidis et al., 1998]. Die lokale oder systemische Gabe des Toxins inhibierte das *in vivo*-Wachstum von humanen Tumoren oder Tumorzellen, die stabil mit ErbB2 transfiziert worden waren [Harwerth et al., 1993; Wels et al., 1995; Altenschmidt et al., 1997; Maurer-Gebhard et al., 1998; Schmidt et al., 2001]. Die Phase I einer klinischen Studie ergab, dass eine systemische Gabe des Einzelkettenantikörper-Toxins verträglich ist. Außerdem konnte eine teilweise neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden [von Minckwitz et al., 2005]. Eine *First-in-man*-Studie mit einem ähnlichen cTCR auf

der Basis des Antikörpers Trastuzumab hatte im Jahre 2010 den Tod der Patientin zur Folge, da die Menge (10^{10}) der verabreichten cTCR-transduzierten Lymphozyten offenbar bei Weitem zu hoch gewählt wurde [Morgan et al., 2010]. Bei der Patientin kam es zur Atemnot, da die Zellen in der Lunge verblieben und dort inflammatorische Cytokine freisetzten, da auch Lungenepithelzellen eine niedrige ErbB2-Expression aufweisen [Press et al., 1990]. Aktuell finden einige klinische Studien der Phase I statt, bei denen die Verträglichkeit und ggf. auch die Wirksamkeit von cTCR gegen ErbB2 weiter getestet werden sollen [Studienidentifikation NCT00902044, NCT01109095 und NCT00889954].

Ausblick

Der in dieser Arbeit durch rhadinovirale Vektoren exprimierte cTCR gegen ErbB2 veranlasste die transduzierten humanen T-Lymphozyten zu einer spezifischen Lyse humaner ErbB2-positiver Tumorzelllinien *in vitro*. Für die *in vivo*-Situation wären Tiermodelle wünschenswert. Die Wirkung TCR-exprimierender humaner T-Zellen könnte in humanisierten Mäusen mit humanen ErbB2-positiven Tumoren getestet werden. Die Verwendung muriner T-Lymphozyten ist nicht praktikabel, da sie sich durch HVS nicht transformieren lassen und kein stabiles Wachstum zustande kommt. Bei nicht-humanen Spezies wie z.B. Makaken sind ErbB2-positive Tumormodelle nicht bekannt. Entsprechend käme eine experimentelle Therapie ggf. dann infrage, wenn bei einem ErbB2-positiven Tumor die konventionellen Therapieformen versagt haben und keine therapeutischen Alternativen mehr zur Verfügung stehen. Insofern eignen sich die bisherigen Experimente vor allem dazu, die grundsätzliche Eignung dieses Vektorsystems für T-Zellen darzulegen. Für einen gezielten therapeutischen Einsatz wären vermutlich andere Zielstrukturen notwendig. Da cTCR gewöhnlich von ohnehin funktionellen monoklonalen Antikörpern abgeleitet sind, wäre die Expression eines kompletten heterodimeren TCRs eine weitere wesentliche Anwendung. In diesem Zusammenhang klonierte ich die Leserahmen für einen kompletten $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR als tetracistronisches Konstrukt an dieselbe Stelle in das virale HVS-Genom, rekonstituierte die Viren und transduzierte mehrere humane T-Lymphozytenpopulationen. $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR stellen den Hauptanteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im Menschen. Ihre Aufgabe ist die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene und besonders gegen hämatologische Tumoren [Kaufmann und Kabelitz, 1991]. Versuche haben gezeigt, dass derartige $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten *in vitro* in der Lage sind, Lymphom- und Myelomzelllinien zu lysieren [Fisch et al., 2000]. Durch HVS-Vektoren mit $\gamma\delta$ -TCR transduzierte T-Zellen sollen dann auf die Transgen-Expression und auf ihre anti-Tumorzell-Aktivität untersucht werden.

5.2 Tumorspezifische Transgenexpression durch regulatorische Elemente des Alpha-Fetoproteins

AFP-abhängige Expression des Tet-Doppelschalters

Die regulatorische Region des zellulären AFP-Gens besteht aus zwei Enhancern, zwei Silencern und einem Promotor [Kaneko und Tamaoki, 2001]. Die komplette Kasette umfasst ca. 5 kb, wodurch sich eine Gesamtgröße des zu inserierenden Bereichs aus Regulationseinheit, Tet-Schalter und Transgen Inserts von fast 11 kb ergibt. Hierbei handelt es sich somit um das bisher größte in das HVS-Genom inserierte Fremd-DNA-Fragment [Toptan et al., 2010a]. Die Insertion der regulatorischen Kasette des AFP-Gens erfolgte in ein Doppelschalter-Tet-On-System, dass sich bereits im BAC-klonierten Virus-Genom befand [Toptan, 2010b]. Die AFP-regulatorische Kasette wurde für die Expression des reversen Tet-abhängigen Transaktivators und des Tet-abhängigen Transsilencers eingesetzt. Deshalb sollten die drei untersuchten Transgene vom AFP-Expressionsstatus der Zelle und von der Anwesenheit von Dox strikt abhängig sein. Bei den Transgenen handelte es sich um eGFP als Kontrolle und um die proapoptotischen Gene für reverse Caspase 3 und tBid. Die Insertion mit Hilfe der *En passant*-Mutagenese durch doppelte homologe Rekombination konnte rasch und zielgerichtet erreicht werden. Die Rekonstitution der Apoptose-induzierenden Viren erfolgte bei niedrigeren Temperaturen (32,5°C), bei denen die Apoptose gehemmt ist und somit höhere Virustiter zu erreichen sind.

Die Transduktionsraten von Hepatomzellen mit HVS waren generell hoch genug [Abb. 4.23; Abb. 4.24], damit klare Aussagen über die Abhängigkeit der Expression von der AFP-Expressionsstärke und von der Dox-Gegenwart möglich wurden. Als AFP-positive Zellen erwiesen sich die Zelllinien Huh7, Huh7.5 und HepG2. Die Zelllinie Huh7.5 wurde für die folgenden Versuche ausgewählt, da sie eine mittelgradige eGFP-Expressionsrate zeigte und in der Zellkultur problemlos handzuhaben war. Die Zelllinien Hep3B, SK-Hep1, HuccT1 und AKN1 hatten keine AFP-Expression. Zum Vergleich wurden deshalb die zwei Zelllinien Hep3B und SK-Hep1 ausgewählt, die eine hohe und eine niedrige eGFP-Expression nach Transduktion mit dem AFP-unabhängigen HVS-Vektor hCGF Δ 1^{rHVS} zeigten. Die Versuche mit eGFP als Transgen wiesen auf eine AFP- und Dox-abhängige Expression des Transgens hin. Die Anzahl der eGFP-exprimierenden Zellen war dabei abhängig von der verwendeten Zelllinie. Die Unterschiede in der eGFP-Expression von Hep3B und SK-Hep1 zeigten sich auch in der Induzierbarkeit der Apoptose.

Apoptose-Induktion durch den AFP- und Tet-regulierten Doppelschalter

Bei Verwendung proapoptotischer Transgene konnte im Westernblot die Dox-induzierte PARP-Spaltung nach 6 h Induktion für alle Zelllinien nachgewiesen werden, die mit dem AFP-unabhängigen HVS-Vektor hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ transduziert worden waren [Abb. 4.25; nicht alle Daten gezeigt]. Da die Westernblots mit reverser Caspase 3 als Transgen (hCCF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$) durchwegs keine PARP-Spaltung zeigten, wurden diese Viren in weiteren Versuchen nicht mehr verwendet. Das Fehlen der Apoptose-Induktion durch die Effektor-Caspase reverse Caspase 3 könnte daran liegen, dass ihre Funktion am Ende der Apoptose-Signalkaskade liegt [Nuñez et al., 1998]. Die Funktion des Proteins tBid liegt dagegen wesentlich früher am Beginn dieser Kaskade und induziert durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und Ca^{2+} sowohl die Umstrukturierung der Zellmembran als auch die Aktivierung der Initiator-Caspase 9 durch Apaf-1. Diese Initiator-Caspase spaltet verschiedene Effektor-Caspasen (3, 6 und 7), wodurch es zu einer breiten Aktivierung der Apoptose kommt.

Nach der Transduktion mit den AFP-abhängigen tBid-Vektoren (AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$) zeigten die Westernblots nur bei der AFP-positiven Zelllinie Huh7.5 eine PARP-Spaltung. Diese Spaltung war jedoch schwach und nur nach längerer Belichtungszeit deutlich zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die Apoptoseinduktion infolge der AFP-regulatorischen Kassette in den Virusvektoren eindeutig von AFP abhängig war. Im Vergleich zu den AFP-unabhängigen PGK-regulierten Virusvektoren war die Stärke der Apoptoseinduktion durch das Einfügen der AFP-regulatorischen Kassette deutlich reduziert. Diese Reduktion zeigte sich auch bei der Auswertung des TUNEL-Tests, die sowohl mikroskopisch als auch im Fluorimeter erfolgte [Abb. 4.27; Tab. 4.2]. In Huh7.5-Zellen zeigten sich in der Quantität der Apoptoseinduktion deutliche Unterschiede zwischen den PGK- und AFP-regulierten Vektoren. Außerdem waren Zelltyp-abhängige Unterschiede zu erkennen. Die AFP-negative Zelllinie SK-Hep1 zeigte im TUNEL-Test eine stärkere grüne Fluoreszenz als Hep3B. Im TUNEL-Test konnte man zusätzlich eine sehr schwache Apoptoseinduktion ohne die Zugabe von Dox erkennen. Diese Hintergrundaktivität (*leakiness*) des Tet-On-Systems war bei Zellen mit ausgeprägter Apoptose in Abwesenheit von Dox stärker sichtbar. Auch die zusätzliche AFP-abhängige Kontrolle konnte die Hintergrundexpression in Abwesenheit von Dox nicht vollständig verhindern, wie es bei der AFP-positiven Zelllinie Huh7.5 zu beobachten war.

In den beiden anderen Apoptosetests (Annexin-V-Propidiumiodid und LDH) zeigten sich in der Zelllinie Huh7.5 allerdings keine quantitativen Unterschiede zwischen den Virusvektoren

mit und ohne AFP-Regulation. Im Annexin-V-Propidiumiodid-Test werden die Zellen mit rot fluoreszierendem Propidiumiodid und grün fluoreszierendem, FITC-gekoppeltem Annexin V angefärbt [Abb. 4.26]. Die Hälfte der Kulturen der transduzierten Zellen wurden für 6 und 24 h mit Dox induziert, im Anschluss markiert und im Durchfluscytometer vermessen (nicht alle Daten gezeigt), während die andere Hälfte der Kulturen kein Dox erhielt. Die Geschwindigkeit der Apoptoseinduktion war in den verschiedenen Hepatomzellen sehr unterschiedlich, sowohl zwischen den Zelllinien als auch zwischen den Virusvektoren. Bei der Zelllinie Huh7.5 zeigte sich schon nach 6 h eine deutliche Zunahme der Annexin-V-Färbung, die auf ein frühes Stadium der Apoptose hinweist. Nach 24 h war der Annexin-V-Status bei den Zellen mit und ohne Dox nahezu gleich, aber der Anteil an Propidiumiodid-gefärbten Zellen nahm um jeweils 20 % zu. Nach 24 h handelte es sich somit um einen späten Zeitpunkt der Apoptose. Die Verschiebung der Signale in den zweidimensionalen Punktwolken war deutlich zu erkennen [Abb. 4.26]. Der Anteil der ungefärbten Zellen war nach 24 h deutlich reduziert. Nach 24 h zeigte sich eine quantitativ vergleichbare Apoptose bei Huh7.5-Zellen, die mit AFP- oder PGK-regulierten tBid-Vektoren (AhCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ bzw. hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$) transduziert worden waren. In den AFP-negativen Zellen konnte die Apoptose mit dem Annexin-V-Propidiumiodid-Test nur dann nachgewiesen werden, wenn diese mit dem AFP-unabhängigen Vektor hCBF $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ transduziert waren. Auch hier war ein deutliches Fortschreiten der Apoptose 24 h nach der Dox-Induktion zu erkennen. Bei SK-Hep1 war nach 6 h nur ein schwacher Anstieg der Zahl Annexin-V-gefärbter Zellen zu sehen. Im zweiten Test wurde die Menge an austretender Laktatdehydrogenase gemessen [Abb. 4.28]. Die LDH-Werte waren bei Huh7.5-Zellen bei beiden Apoptose induzierenden viralen Vektoren wiederum gleich stark. Bei Hep3B-Zellen war in diesem Test die Apoptose deutlicher zu erkennen als im TUNEL-Test. Die nicht transduzierten Kontrollzellen und die mit WTf $\Delta 1^{\text{rHVS}}$ -transduzierten Hepatomzellen zeigten generell sehr niedrige Apoptoseraten und keine Apoptose-Induktion nach Dox-Gabe. Entsprechend löst die HVS-Transduktion weder eine Lyse der Hepatomzellen aus, noch führt sie zur Virusreplikation.

Kinetik der Apoptose-Induktion

Im Vergleich zu der konstitutiv PGK-regulierten Variante der Virusvektoren war die Apoptose-Induktion bei den Vektoren mit der AFP-regulatorischen Kassette deutlich verzögert. In den Versuchen nach 6 h Dox-Induktion war ein quantitativer Unterschied der Apoptosemerkmale im TUNEL-Test und PARP-Nachweis zu erkennen. Nach 24 h war dieser quantitative Unterschied (LDH bzw. Annexin V) nicht vorhanden. Das bedeutet, dass nach Transduktion durch die PGK-regulierten Vektoren das frühe Stadium der Apoptose stärker abläuft als bei den

AFP-regulierten Virusvektoren. Der Grund für diese verzögerte Induktion dürfte im generell schwächeren Transgen-Expressions-Niveau liegen, das durch eGFP nachgewiesen wurde.

Bei dem Annexin-V-Propidiumiodid-Test wird einerseits die Annexin-V-Menge auf der Außenseite der Zellmembran detektiert und andererseits werden Zellen mit poröser Zellmembran nachgewiesen, wodurch Propidiumiodid bis in den Zellkern gelangen und in die DNA interkalieren kann. Beim LDH-Test wird ebenfalls die Menge der Zellen gemessen, die bereits eine poröse Zellmembran haben. Diese Parameter werden erst in einem späten Zeitpunkt der Apoptose sichtbar und können somit erst 24 h nach der Dox-Induktion bestimmt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Apoptoseraten in den Zellen, die durch die PGK- und AFP-regulierten Vektoren induziert wurden, wieder auf demselben Niveau.

Der Virusvektor mit der AFP-Regulation des Tet-Doppelschalters ist somit in der Lage, abhängig von der zellulären AFP-Expression Apoptose zu induzieren. Die AFP-abhängige Apoptose ist im Vergleich zur AFP-unabhängigen Apoptose zeitlich verzögert, zeigt jedoch nach 24 h eine vergleichbare Effizienz. Die Kombination der hier beschriebenen Methoden ermöglicht somit eine zeitliche aufgelöste Betrachtung der Apoptoseinduktion in Hepatomzellen.

AFP-regulierte Virusvektoren

Die AFP-abhängige Expression von Suizidgenen wurde bereits mit einem gentherapeutischen adenoviralen Vektor beschrieben [Kaneko und Tamaoki, 2001]. In der Arbeit wurde eine verkürzte AFP-regulatorische Kassette mit dem Rous-Sarkom-Virus-Promotor verglichen. Die Expression der HSV-1-Thymidinkinase sollte hier gezielt in AFP-produzierenden Zellen induziert werden. Die Thymidinkinase wandelt Desoxythymidin zu Desoxythymidinphosphat um, das nach weiterer Phosphorylierung in die DNA eingebaut werden kann. Das Medikament Ganciclovir wird durch die virale Thymidinkinase monophosphoryliert, dann durch zelluläre Kinasen zum Triphosphat erweitert und induziert beim Einbau in die zelluläre DNA den Kettenabbruch. Die AFP-negative Zelllinie SK-Hep1 zeigte nach Infektion mit diesem Vektor keine Thymidinkinaseexpression. Bei einem Vektor ohne die AFP-regulatorische Kassette wurde hingegen eine Expression festgestellt. In der AFP-positiven Zelllinie Huh7 zeigte sich bei beiden Vektoren eine Expression der Thymidinkinase. Nacktmäusen wurden Huh7- oder SK-Hep1-Zellen und Ganciclovir intraperitoneal injiziert. Die Tumore, die mit dem Vektor ohne die AFP-regulatorische Kassette transduziert wurden, bildeten sich in allen Mäusen vollständig zurück. Von den Tumoren, die mit dem Vektor mit regulatorischer AFP-Kassette

transduziert wurden, bildeten sich nur die zurück, die aus AFP-positiven Huh7-Zellen bestanden. Auch in diesen Versuchen zeigte sich, dass die Transgenexpression in den Zellen mit AFP-Vektoren geringer war als in Zellen mit normalen Vektoren [Kaneko und Tamaoki, 2001]. Die vom AFP-Promotor abhängige Expression der Thymidinkinase von HSV-1 wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [Su et al., 1997; Mawatari et al., 1998]. Es wurden jedoch auch andere Gene durch den AFP-Promotor reguliert exprimiert. In einem replikationsdefekten retroviralen Vektor wurde die transkriptionsregulatorische Sequenz von AFP mit der codierenden Domäne der Thymidinkinase des Varicella-Zoster-Virus kombiniert. Dieser Vektor wurde dazu verwendet, HepG2-Zellen zu transduzieren. Die Expression der Thymidinkinase korrelierte mit der endogenen Expression von AFP in den meisten Einzelzellklonen [Huber und Richards, 1996]. In einem rekombinanten Adenovirus wurde die Recombinase Cre unter dem AFP-Promotor exprimiert. Die Expression wurde in *in vitro*- und in *in vivo*- Tumormodellen gezeigt [Sato et al., 1998]. In vorangegangenen Arbeiten wurden Luciferasevektoren kloniert, die als Promotor-Elemente entweder nur den AFP-Promotor oder die komplette regulatorische Kassette von AFP enthielten. Eine hepatomzellspezifische und starke Expression der Luciferase war nur mit der regulatorischen Kassette möglich. Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur beschrieben [Watanabe et al., 1987; Ido et al., 1995, Hurtado Picó et al., 2005]. Fragmente des AFP-Enhancer-Promotors, denen wesentliche Abschnitte fehlen, konnten keine AFP-spezifische Transgenexpression vermitteln [Lam et al., 2007]. Deshalb wurden andere Promotoren wie der PGK-Promotor in Verbindung mit der AFP-regulatorischen Kassette verwendet [Cao et al., 2001]. Dabei erwiesen sich sowohl der AFP-Enhancer als auch der AFP-Silencer als entscheidend bei der tumorselektiven AFP-Expression [Watanabe et al., 1987; Nakabayashi et al., 1991]. Außerdem hatten Vektoren ohne die AFP-Silencer zwar eine hohe Tumorspezifität, zeigten aber auch eine Transgenexpression in Tumoren mit sehr schwacher AFP-Produktion [Kanai et al., 1996; Igarashi et al., 1998; Mawatari et al., 1998].

Ausblick

Die Ergebnisse aus der Literatur legen nahe, dass die Expressionsraten der AFP-Regulationseinheit durch die Integration eines heterologen Promotors verbessert werden könnten. Damit könnte eine höhere Transgenexpression und eine frühere Apoptose-Induktion nach Dox-Gabe erreicht werden. In Analogie zur Nutzung der AFP-Regulation könnten auch andere Zelltyp-spezifische Regulationseinheiten für die Kontrolle des Tet-Doppelschalters eingesetzt werden. Hierfür ist die hohe Klonierungskapazität von HVS-Vektoren vorteilhaft.

5.3 T-Zell-spezifische Expression durch den CD2-Enhancer-Promotor

In meiner Diplomarbeit sollte die regulierte Fremdgen-Expression in T-Lymphozyten verbessert werden [Hüske, 2010]. Dort gelang zwar die Expression des eGFP, jedoch konnte durch den Austausch gegen apoptotische Gene (tBid und reverse Caspase 3) die Apoptose nur in Jurkat-Zellen und nicht in primären humanen T-Lymphozyten induziert werden. Durch die Verwendung des CD2-Promotors oder der Kombination aus CD2-Promotor und CD2-Enhancer sollten die vorliegenden rekombinanten viralen HVS-Vektoren für humane T-Lymphozyten verbessert werden. In humanen T-Lymphozyten kommt es in Folge der Transformation durch HVS zu einer verstärkten Proliferation durch eine CD2-Hyperreaktivität [Mittrücker et al., 1992]. Da CD2 in primären und in transformierten T-Zellen stark exprimiert wird, sollte sich der CD2-Enhancer-Promotor für diesen Zweck eignen, den Tet-Doppelschalter T-Zell-spezifisch zu exprimieren. Nach der Virusrekonstitution aus den durch Rekombination generierten BAC-Varianten wurden primäre humane T-Lymphozyten mit Viren transduziert, die eGFP unter Kontrolle der verschiedenen Promotorelemente exprimierten. Hier zeigte sich, dass die Transgen-Expression durch den Einbau der CD2-Elemente im Vergleich zu dem HTLV-EF1 α -Hybridpromotor nicht gesteigert werden konnte [Abb. 4.32]. Die Hintergrundaktivität des Tet-Schalters in Abwesenheit von Dox war weiterhin vorhanden. Die geringere Hintergrundaktivität bei den CD2-regulierten Viren dürfte auf die generell niedrige eGFP-Expressionsrate zurück zu führen sein. Vier Wochen nach der Transduktion und Induktion der Zellen war keine eGFP-Expression mehr vorhanden. Trotzdem wurden in der Folge humane T-Lymphozyten mit den CD2-regulierten Apoptosegen-tragenden Viren transduziert und es wurde versucht, die Apoptose zu induzieren [Abb. 4.33]. Eine signifikante Steigerung der Apoptoseinduktion war nach Dox-Gabe nicht zu sehen. Da in der vorangegangenen Diplomarbeit die Apoptose zumindest in Jurkat-Zellen gezeigt werden konnte, wurden auch diese mit den Apoptosegen-tragenden Viren infiziert [Abb. 4.34]. Die Ausgangsviren mit dem Fusionspromotor und tBid als Apoptosegen konnten nach 6 h eindeutig eine Apoptose induzieren. Die Viren mit den CD2-Elementen waren jedoch selbst in den Jurkat-Zellen hierzu nicht in der Lage. Für derartige experimentelle Ansätze käme die Verwendung anderer, stark T-Zell-spezifischer Enhancer-Promotoren infrage.

5.4 Glykoprotein 130

Zur Expression des murinen Glykoproteins gp130 wurden gp130 und dsRed über eine IRES-Sequenz verbunden und als konstitutiv exprimierte und als Dox-induzierte Variante mit verschiedenen Promotoren (HTLV-EF1 α -Fusionspromotor oder hCMV-Promotor) und in beiden Orientierungen in den Leserahmen ORF75 ins virale Genom rekombiniert. Die Viren wurden rekonstituiert und die Transduktionsraten in der ovariellen Hamsterzelllinie CHO und in der murinen Pro-B-Zell-Linie BAF3 ausgetestet. Da sich BAF3 nicht mit HVS infizieren ließ, diente die Hamsterzelllinie CHO als Grundlage für die Expressions- und Funktionsexperimente. Die Analyse der dsRed-Expression der Zellen im Durchflusscytometer zeigte [Abb. 4.39], dass die konstitutive Variante und die Dox-induzierte Variante mit dem HTLV-Fusionspromotor keine Expression aufwies. Dagegen ermöglichten die Dox-induzierten Varianten mit dem hCMV-Promotor eine induzierte dsRed-Expression in den Hamsterzellen. Im Westernblot wurde parallel dazu die gp130-Expression in diesen Zellen analysiert [Abb. 4.40A]. Die gewonnenen Ergebnisse stimmten mit denen der dsRed-Expression überein, wobei eine geringe gp130-Expression auch in der Dox-induzierten reversen Variante mit dem HTLV-EF1 α -Promotor zu finden war. Das Dox-induzierte Konstrukt mit dem hCMV-Promotor in direkter Orientierung wurde im Weiteren dazu verwendet, die Funktionalität von gp130 zu bestimmen. Dazu wurden transduzierte CHO-Zellen für verschiedene Zeiträume mit IL-6 induziert und die Menge an phosphoryliertem STAT3 bestimmt. STAT3 wandert nach seiner Phosphorylierung als Homo- oder Heterodimer in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsaktivator. Mit dem hCMV-regulierten Virusvektor transduzierte CHO-Zellen zeigten eine starke STAT3-Aktivierung nach Gabe von Dox und IL-6 nach 15 min [Abb. 4.40B].

Diese Virusvektoren wurden im Institut für Physiologie der Medizinischen Universität Innsbruck zur Transduktion primärer Mausneurone eingesetzt, bei denen infolge einer konditionalen gp130-Defektmutation [Andratsch et al., 2009] keine gp130-Expression und dadurch ein Defekt in nozizeptiven Funktionen vorliegt. In Vorversuchen war die Suszeptibilität von Mausneuronen für die Transduktion mit HVS bereits gezeigt [Hüske, 2010; Toptan, 2010]. Nach der Transduktion und in Gegenwart von Dox zeigte sich die Ausbildung von Neuriten, die in Abwesenheit von Dox unterblieb. Somit konnte hier die funktionelle Rekonstitution eines genetischen Defekts durch die Transduktion primärer sensorischer Maus-Neurone gezeigt werden.

5.5 miRNAs von Herpesvirus saimiri

In diesem Projekt wurde eine konservierte virale miRNA von HVS identifiziert und untersucht. Zu Beginn wurde der entsprechende DNA-Bereich aus verschiedenen HVS-Stämmen unterschiedlicher Subgruppen sequenziert und daraus eine Sekundärstruktur vorhergesagt [Tab. 4.3; Abb. 4.42]. Durch die Verwendung von TaqMan-Sonden für den 5p-Arm und 3p-Arm der miRNA HSUR2 von HVS C488 wurden verschiedene lytisch und latent infizierte Zellsysteme auf die Anwesenheit dieser miRNA untersucht. Die miRNA konnte sowohl in infizierten OMK-Zellen als auch in transduzierten T-Lymphozyten vom Menschen und vom Affen nachgewiesen werden [Abb. 4.43A]. Der Nachweis der HSUR2 erfolgte im Anschluss zusätzlich durch Northernblots [Abb. 4.43B] und das NGS-Verfahren [Tab. 4.4]. Anschließend wurde die Regulation zellulärer miRNAs in den verschiedenen Proben durch NGS untersucht, wobei nur die häufigsten fünf zellulären miRNAs in jeder Probe aufgeführt wurden [Tab. 4.5]. Drei zelluläre miRNAs traten dabei vermehrt auf. Eine Hochregulation der zellulären miR-155 war in allen infizierten Zellen zu finden. Die miR-155 ist eine mehrfach beschriebene, multifunktionelle miRNA [Eis et al., 2005; Kluiver et al., 2005; Tam und Dahlberg, 2006; Faraoni et al., 2009; Zhang et al., 2013]. Diese miRNA spielt eine Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie der hämatopoetischen Differenzierung, Immunologie, Entzündung, Tumorigenese und bei kardiovaskulären Erkrankungen [Esquela-Kerscher und Slack, 2006; Martin et al., 2006; Giromella et al., 2007; Masaki et al., 2007; O’Connell et al., 2007; Rodriguez et al., 2007]. miRNAs, die mit Tumorigenese in Verbindung stehen, werden als Oncomirs bezeichnet [Esquela-Kerscher und Slack, 2006]. Außerdem steht miR-155 in Verbindung mit Infektionen durch DNA-Viren [Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007; Yin et al., 2008]. Die miR-21 war in den untersuchten Proben am zweithäufigsten zu finden [Krichevsky und Gabriely, 2009]. Hierbei handelt es sich um die erste beschriebene Oncomir. Die zelluläre miR-21 ist in vielen Tumorarten herunterreguliert, dazu zählen Gliome, Mamma-, Ovarial-, Prostatakarzinome und Leukämien [Chan et al., 2005; Volinia et al., 2005; Fulci et al., 2007; Iorio et al., 2007; Frankel et al., 2008]. Die miR-21 ist stark konserviert [Fujita et al., 2008] und viele ihren Zielmoleküle sind Tumorsuppressoren [Meng et al., 2007; Zhu et al., 2007; Asangani et al., 2008; Zhu et al., 2008]. An Platz drei der gefundenen zellulären miRNAs stand Let-7. Let-7 ist eine konservierte miRNA, die zuerst bei *C. elegans* gefunden wurde [Pasquinelli et al. 2000; Reinhart et al., 2000]. Let-7 ist die erste beschriebene anti-Oncomir [Johnson et al., 2005; Johnson et al., 2007]. Der genaue Mechanismus, über den die virale miRNA aus HSUR2 von HVS C488 die zellulären miRNAs beeinflussen, muss noch erforscht werden. Die Regulation von miR-155 wird dabei im Vor-

dergrund stehen, da diese zelluläre miRNA bereits im Zusammenhang mit viralen Infektionen gezeigt wurde.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AFP	Alpha-Fetoprotein
AM	Acetoxymethylester
Amp	Ampicillin
Apaf-1	apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor-1
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> (bakterielles artifizielles Chromosom)
BATDA	Acetoxymethylester eines fluoreszenzverstärkenden Liganden
BGH	Terminator des Rinderwachstumshormons
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BLT	Benzyloxycarbonyl-L-Lysin-Thiobenzylester
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> (Chimärer Antigenrezeptor)
CB	costimulatorische Bindungsdomäne
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cHS4	β-Globin-Isolator aus dem Hühnergenom
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CMA	Concanamycin A
CNTF	ziliärer neurotropher Faktor
CPE	cytopathischer Effekt
CT-1	Cardiotrophin-1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzung	Bedeutung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
dpi	days post infection (Tage nach der Infektion)
dsRed	<i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzol-Säure)
E	Effektor-T-Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermal Wachstumsfaktorfamilie)
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
Enh	Enhancer
ER	endoplasmatischen Retikulum
ErbB2	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunden
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> (hepatozelluläres Karzinom)
hCMV	humanes Cytomegalovirus
H-DNA	<i>high density</i> DNA (DNA mit hoher Dichte)
HNF1	<i>hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A</i>
HR	Homologe Region
HSUR	<i>Herpesvirus saimiri</i> U RNA
HTLV-1	humanes T-lymphotropes Virus Typ 1
HTLV P	Fusionspromotor aus dem Promotor des humanen T-lymphotropen Virus Typ 1 und des Promotors für den Elongationsfaktor 1 α
HVS	Herpesvirus saimiri
IL	Interleukin

Abkürzung	Bedeutung
INT	Tetrazoliumsalm
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv)
K	T-Lymphozytensponder
Kana ^R	Kanamycin-Resistenzkassette
kb	Kilobasenpaare
LANA	Latenz-assoziiertes nukläres Antigen
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
L-DNA	<i>low density</i> DNA (DNA mit geringer Dichte)
LDH	Laktatdehydrogenase
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie-Inhibitor-Faktor
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
MDA-MB	Monroe Dunaway Anderson-Metastatic Breast
M-DNA	<i>intermediate density</i> DNA (DNA mit mittlerer Dichte)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mini-F	bakterielles F-Plasmid, Minimalvariante
MMTV	<i>Maus-Mammatumovirus</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Infektionsmultiplizitäten)
mpi	<i>month post infection</i> (Monate nach der Infektion)
NGS	<i>next generation sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation)
OMK	<i>owl monkey kidney</i> (Krallenaffen-Nierenzellen)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
OSM	Oncostatin-M
p	Promotor
pA	polyA-Sequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

Abkürzung	Bedeutung
PE	Phycoerythrin
PFU	<i>plaque forming units</i> (Plaques-formenden Einheiten)
PGK	Phosphoglyceratkinase
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RecA	<i>recombination A</i>
revCasp3	reverse Caspase 3
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
rHVS	rekombinantes <i>Herpesvirus saimiri</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
rtTA	reverser tetracyclin-abhängiger Transaktivator
scfr	<i>single chain antibody fragment</i> (Einzelkettenantikörperfragment)
scFv	<i>single chain variable fragment</i> (variables Einzelkettenfragment)
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
StpC	Saimiri transformationsassoziiertes Protein der Untergruppe C
T	Terminator
T _M	Schmelztemperatur
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
tBid	verkürztes Bid
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
Tet	Tetracyclin
TetA	Tetracyclin-Antiporter
TetO	Tetracyclin-Operatoren
TetR	Tetracyclin-Repressor
tTA	tetracyclin-abhängiger Transaktivator

Abkürzung	Bedeutung
tTS	tetracyclin-abhängiger Transsilencer
Tip	Tyrosinkinase-interagierendes Protein
TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> (terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase-vermittelter dUTP-Biotin End-Markierungsassay)
Tyk	Tyrosinkinasen
U	Unit
WB	Westernblot
wpi	<i>week post infection</i> (Wochen nach der Infektion)
Z	Zielzellen
ZAP-70	<i>Zeta-Chain Associated Protein Kinase of 70 kDa</i>

7 Literaturverzeichnis

- Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova N. I., Postnikova Z. A. und Irlin I. S. (1963) Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1, 174 - 180.
- Abelev, G. I., Assecritova, I. V., Kraevsky, N. A., Perova, S. D. und Perevodchikova, N. I. (1967) Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value. *Int J Cancer* 2, 551 - 558.
- Abram, C. L. und Lowell, C.A. (2007) The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Sci STK* 13.
- Adams, J. M. und Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322 - 1326.
- Adams, J. M. und Cory, S. (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 715 - 720.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles B. B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615 - 616.
- Akira, S., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54, 1 - 78.
- Albrecht, J. C. und Fleckenstein, B. (1992) Nucleotide sequence of HSUR 6 and HSUR 7, two small RNAs of herpesvirus saimiri. *Nucleic Acids Res* 20, 1810.
- Albrecht, J. C., Nicholas, J., Biller, D., Cameron, K. R., Biesinger, B., Newman, C., Wittmann, S., Craxton, M. A., Coleman, H., Fleckenstein, B. und Honess, R. W. (1992) Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J Virol* 66, 5047 - 5058.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. und Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Alpert, M. E., Uriel, J. und de Nechaud, B. (1968) Alpha-1 fetoglobulin in the diagnosis of human hepatoma. *N Engl J Med* 278, 984 - 986.
- Alpert, E., Hershberg, R., Schur, P. H. und Isselbacher, K. J. (1971) Alpha-fetoprotein in human hepatoma: improved detection in serum, and quantitative studies using a new sensitive technique. *Gastroenterology* 61, 137 - 143.
- Altenschmidt, U., Kahl, R., Moritz, D., Schnierle, B. S., Gerstmayer, B., Wels, W. und Groner, B. (1996) Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2, 1001 - 1008.
- Altenschmidt, U., Schmidt, M., Groner, B. und Wels, W. (1997) Targeted therapy of schwannoma cells in immunocompetent rats with an erbB2-specific antibody-toxin. *Int J Cancer* 73, 117 - 124.

- Anderson, R.G. (1998)** The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199 - 225.
- Andratsch, M., Mair, N., Constantin, C. E., Scherbakov, N., Benetti, C., Quarta, S., Vogl, C., Sailer, C. A., Uceyler, N., Brockhaus, J., Martini, R., Sommer, C., Zeilhofer, H. U., Müller, W., Kuner, R., Davis, J. B., Rose-John, S. und Kress, M. (2009)** A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. *J Neurosci* 29, 13473 - 13483.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitely, R. und Yamanishi, K. (2007)** Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis. Cambridge University Press
- Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S. und Allgayer, H. (2008)** MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128 - 2136.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M. (1998)** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305 - 1308.
- Barbosa, J. A., Mentzer, S. J., Kamarck, M. E., Hart, J., Biro, P. A., Strominger, J. L. und Burakoff, S. J. (1986)** Gene mapping and somatic cell hybrid analysis of the role of human lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) in CTL-target cell interactions. *J Immunol* 136, 3085 - 3091.
- Bargmann, C. I., Hung, M. C. und Weinberg, R. A. (1986)** The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226 - 230.
- Basso, A. D., Solit, D. B., Munster, P. N. und Rosen, N. (2002)** Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21, 1159 - 1166.
- Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P. P. und Carpenter, G. (1996)** All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271, 5251 - 5257.
- Berens, C. und Hillen, W. (2004)** Gene regulation by tetracyclines. *Genet Eng (NY)* 26, 255 - 277.
- Berger, M. S., Locher, G. W., Saurer, S., Gullick, W. J., Waterfield, M. D., Groner, B. und Hynes, N. E. (1988)** Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 48, 1238 - 1243.
- Betz, U. A., Bloch, W., van den Broek, M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K. und Müller, W. (1998)** Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med* 188, 1955 - 1965.
- Bierer, B. E., Sleckman, B. P., Ratnofsky, S. E. und Burakoff, S. J. (1989)** The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 7, 579 - 599.
- Biesinger, B., Müller-Fleckenstein, I., Simmer, B., Lang, G., Wittmann, S., Platzer, E., Desrosiers, R. C. und Fleckenstein, B. (1992)** Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3116 - 3119.
- Billen, L. P., Shamas-Din, A. und Andrews, D. W. (2009)** Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27, 93 - 104.

- Birkholz, K., Hombach, A., Krug, C., Reuter, S., Kershaw, M., Kämpgen, E., Schuler, G., Abken, H., Schaft, N. und Dörrie, J. (2009) Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther* 16, 596 - 604.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513 - 1523.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A. und Anderson W. F. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475 - 480.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. und Rice, C. M. (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76, 13001 - 13014.
- Boatright, K. M. und Salvesen, G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725 - 731.
- Boersma, H. H., Kietselaer, B. L. J. H., Stolk, L. M. L., Bennaghmouch, A., Hofstra, L., Narula, J., Heidendal, G. A. K. und Reutelingsperger, C. P. M. (2005) Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 46, 2035 - 2050.
- Bonini, C., Bondanza, A., Perna, S. K., Kaneko, S., Traversari, C., Ciceri, F. und Bordignon, C. (2007) The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Mol Ther* 15, 1248 - 1252.
- Bornkamm, G. W., Delius, H., Fleckenstein, B., Werner, F. J. und Mulder, C. (1976) Structure of Herpesvirus saimiri genomes: arrangement of heavy and light sequences in the M genome. *J Virol* 19, 154 - 161.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. und Feuillard, J. (2005) Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Bots, M. und Medema, J. P. (2006) Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 119, 5011 - 5014.
- Bouard, D., Alazard-Dany, D. und Cosset, F. L. (2000) Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* 157, 153 - 165.
- Brivanlou, A. H. und Darnell, J. E. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813 - 818.
- Bröker, B. M., Tsygankov, A. Y., Müller-Fleckenstein, I., Guse, A. H., Chitaev, N. A., Biesinger, B., Fleckenstein, B. und Emmrich, F. (1993) immortalization of human T cell clones by herpesvirus saimiri. Signal transduction analysis reveals functional CD3, CD4, and IL-2 receptors. *J Immunol* 151, 1184 - 1192.
- Brune, W., Messerle, M. und Koszinowski, U. H. (2000) Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet* 16, 254 - 259.
- Burden, S. und Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847 - 855.

- Cailleau, R., Olivé, M. und Cruciger, Q. V. (1978)** Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* *11*, 911 - 915.
- Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. und Wucherpfennig, K. W. (2002)** The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* *111*, 967 - 979.
- Call, M. E. und Wucherpfennig, K. W. (2005)** The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annual Review of Immunology* *23*, 101 - 125.
- Cao, G., Kuriyama, S., Gao, J., Nakatani, T., Chen, Q., Yoshiji, H., Zhao, L., Kojima, H., Dong, Y., Fukui, H. und Hou, J. (2001)** Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter. *Eur J Cancer* *37*, 140 - 147.
- Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A. und Schmitz, M. (2010)** Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotechnol* Artikel ID 956304.
- Cavaliere, S., Cazzaniga, S., Geuna, M., Magnani, Z., Bordignon, C., Naldini, L. und Bonini, C. (2003)** Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood* *102*, 497 - 505.
- Cazalla, D., Xie, M. und Steitz, J. A. (2011)** A primate herpesvirus uses the integrator complex to generate viral microRNAs. *Mol Cell* *43*, 982 - 992.
- Chan, A. C., Desai, D. und Weiss, A. (1994)** The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Ann Rev Immunol* *12*, 555 - 592.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M. und Kosik, K. S. (2005)** MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* *15*, 6029 - 6033.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. und Bartel, D. P. (2004)** MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* *303*, 83 - 86.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. und Guegler, K. J. (2005)** Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *33*, e179.
- Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P. und Abken, H. (2004)** T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol* *173*, 7647 - 7653.
- Conrad, N. K., Fok, V., Cazalla, D., Borah, S. und Steitz, J. A. (2006)** The challenge of viral snRNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *71*, 377 - 384.
- Cook, H. L., Lytle, J. R., Mischo, H. E., Li, M. J., Rossi, J. J., Silva, D. P., Desrosiers, R. C. und Steitz, J. A. (2005)** Small nuclear RNAs encoded by Herpesvirus saimiri upregulate the expression of genes linked to T cell activation in virally transformed T cells. *Curr Biol* *15*, 974 - 979.
- Cooke, M. P. und Perlmutter, R. M. (1989)** Expression of a novel form of the *fyn* proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol* *1*, 66 - 74.

- Cooper, L. J., Topp, M. S., Serrano, L. M., Gonzalez, S., Chang, W. C., Naranjo, A., Wright, C., Popplewell, L., Raubitschek, A., Forman, S. J. und Jensen, M. C. (2003)** T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* *101*, 1637 - 1644.
- Couet, J., Sargiacomo, M. und Lisanti, M. P. (1997)** Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* *272*, 30429 - 30438.
- Courtois, G., Morgan, J. G., Campbell, L. A., Fourel, G. und Crabtree, G. R. (1987)** Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* *238*, 688 - 692.
- Cox, M. M. (2007)** Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* *8*, 127 - 138.
- Daniel, M. D., Silva, D. und Ma, N. (1976)** Establishment of owl monkey kidney 210 cell line for virological studies. *In Vitro* *12*, 290 - 294.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000)** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* *97*, 6640 - 6645.
- Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y. und Yancopoulos, G. D. (1993)** LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* *260*, 1805 - 1808.
- Davis, S. J. und van der Merwe, P. A. (1996)** The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* *17*, 177 - 187.
- de Carli, M. D., Berthold, S., Fickenscher, H., Fleckenstein, I. M., D'Elia, M. M., Gao, Q., Biagiotti, R., Giudizi, M. G., Kalden, J. R. und Fleckenstein, B. (1993)** Immortalization with herpesvirus saimiri modulates the cytokine secretion profile of established Th1 and Th2 human T cell clones. *J Immunol* *151*, 5022 - 5030.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G. A. und Hillen, W. (1991)** Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob Agents Chemother* *35*, 1591 - 1595.
- Desrosiers, R. C., Burghoff, R. L., Bakker, A. und Kamine, J. (1984)** Construction of replication-competent herpesvirus saimiri deletion mutants. *J Virol* *49*, 343 - 348.
- Desrosiers, R. C., Kamine, J., Bakker, A., Silva, D., Woychik, R. P., Sakai, D. D. und Rottman, F. M. (1985)** Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a herpesvirus vector. *Mol Cell Biol* *5*, 2796 - 2803.
- Deutsch, H. F. (1991)** Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* *56*, 253 - 312.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R. und Aaronson, S. A. (1987)** erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* *237*, 178 - 182.
- Di Marco, E., Pierce, J. H., Knicley, C. L. und Di Fiore, P. P. (1990)** Transformation of NIH 3T3 cells by overexpression of the normal coding sequence of the rat neu gene. *Mol Cell Biol* *10*, 3247 - 3252.

- Duboise, S. M., Guo, J., Czajak, S., Desrosiers, R. C. und Jung, J. U. (1998) STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J Virol* 72, 1308 - 1313.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E. und Rosenberg, S. A. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850 - 854.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. und Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383 - 424.
- Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E. und Dahlberg J. E. (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3627 - 3632.
- Elinav, E., Waks, T. und Eshhar, Z. (2008) Redirection of regulatory T cells with pre-determined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 134, 2014 - 2024.
- Elinav, E., Adam, N., Waks, T. und Eshhar, Z. (2009) Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. *Gastroenterology* 136, 1721 - 1731.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495 - 516.
- Engelman, J. A., Lee, R. J., Karnezis, A., Bearss, D. J., Webster, M., Siegel, P., Muller, W. J., Windle, J. J., Pestell, R. G. und Lisanti M. P. (1998) Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem* 273, 20448 - 20455.
- Ensser, A., Pfänder, A., Müller-Fleckenstein, I. und Fleckenstein, B. (1999) The URNA genes of herpesvirus saimiri (strain C488) are dispensable for transformation of human T cells in vitro. *J Virol* 73, 10551 - 10555.
- Ensser, A., Thureau, M., Wittmann, S. und Fickenscher, H. (2003) The genome of herpesvirus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. *Virology* 314, 471 - 487.
- Ensser, A. und Fleckenstein, B. (2005) T-cell transformation and oncogenesis by gamma2-herpesviruses. *Adv Cancer Res* 93, 91 - 128.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. und Schindler, D. G. (1993) Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 720 - 724.
- Eshhar, Z., Bach, N., Fitzer-Attas, C. J., Gross, G., Lustgarten, J., Waks, T. und Schindler, D. G. (1996) The T-body approach: potential for cancer immunotherapy. *Springer Semin Immunopathol* 18, 199 - 209.
- Esquela-Kerscher, A. und Slack, F. J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259 - 269.

- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J. und Bonmassar, E. (2009)** miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 1792, 497 - 505.
- Fickenscher, H., Biesinger, B., Knappe, A., Wittmann, S. und Fleckenstein, B. (1996)** Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J Virol* 70, 6012 - 6019.
- Fickenscher, H. und Fleckenstein, B. (2001)** Herpesvirus saimiri. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 545 - 567.
- Filby, A., Seddon, B., Kleczkowska, J., Salmond, R., Tomlinson, P., Smida, M., Lindquist, J. A., Schraven, B. und Zamoyska, R. (2007)** Fyn regulates the duration of TCR engagement needed for commitment to effector function. *J Immunol* 179, 4635 - 4644.
- Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A. und Ochoa, A. (1999)** Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 20, 158 - 160.
- Fisch, P., Moris, A., Rammensee, H. G. und Handgretinger, R. (2000)** Inhibitory MHC class I receptors on gammadelta T cells in tumour immunity and autoimmunity. *Immunol Today* 21, 187 - 191.
- Fleckenstein, B. und Desrosiers, R. C. (1982)** The herpesviruses. Plenum, NY, 253.
- Fogh, J. und ed. (1975)** Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press, 115 - 159
- Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A. und Lund A. H. (2008)** Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 1026 - 1033.
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K. und Iba, H. (2008)** miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* 378, 492 - 504.
- Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., Maggio, R., Peragine, N., Santangelo, S., Mauro, F. R., Landgraf, P., Tuschl, T., Weir, D. B., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Guarini, A., Foà, R. und Macino, G. (2007)** Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109, 4944 - 4951.
- Full, F., Lehner, M., Thonn, V., Goetz, G., Scholz, B., Kaufmann, K. B., Mach, M., Abken, H., Holter, W. und Ensser, A. (2010)** T cells engineered with a cytomegalovirus-specific chimeric immunoreceptor. *J Virol* 84, 4083 - 4088.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G. und Lisanti M. P. (1998)** Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17, 6633 - 6648.
- Gascoigne, N. R., Zal, T. und Alam, S. M. (2001)** T-cell receptor binding kinetics in Tcell development and activation. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2001, 1 - 17.
- Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S. F. und Cosman, D. (1992)** The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255, 1434 - 1437.

- Gironella, M., Seux, M., Xie, M. J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, J., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M. L., Jeang, K. T., Chaix, A., Fazli, L., Motoo, Y., Wang, Q., Rocchi, P., Russo, A., Gleave, M., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L., Carrier, A., Pébusque, M. J. und Duseti, N. J. (2007) Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16170 - 16175.
- Goff, S. P. und Berg, P. (1976) Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9, 695 - 705.
- Golembe, T. J., Yong, J., Battle, D. J., Feng, W., Wan, L. und Dreyfuss, G. (2005) Lymphotropic Herpesvirus saimiri uses the SMN complex to assemble Sm cores on its small RNAs. *Mol Cell Biol* 25, 602 - 611.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547 - 5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766 - 1769.
- Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W. H., Chi, J. T., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Ohler, U. und Cullen, B. R. (2007) A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450, 1096 - 1099.
- Grassmann, R. und Fleckenstein, B. (1989) Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J Virol* 63, 1818 - 1821.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Korsmeyer, S. J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156 - 1163.
- Grundhoff, A. und Sullivan, C. S. (2011) Virus-encoded microRNAs. *Virology* 411, 325 - 343.
- Haas W., Pereira P. und Tonegawa S. (1993) Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 11, 637 - 685.
- Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G. P., Berry, C. C., Martinache, C., Rieux-Laucat, F., Latour, S., Belohradsky, B. H., Leiva, L., Sorensen, R., Debré, M., Casanova, J. L., Blanche, S., Durandy, A., Bushman, F. D., Fischer, A. und Cavazzana-Calvo, M. (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 363, 355 - 364.
- Harwerth, I. M., Wels, W., Marte, B. M. und Hynes, N. E. (1992) Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem* 267, 15160 - 15167.
- Harwerth, I. M., Wels, W., Schlegel, J., Müller, M. und Hynes, N. E. (1993) Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumour cell growth. *Br J Cancer* 68, 1140 - 1145.
- He, L. und Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in generegulation. *Nat Rev Genet* 5, 522 - 531.

- Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., Pinkoski, M. J., Shore, G. C., Green, D. R. und Bleackley, R. C. (2000)** Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* *192*, 1391 - 1402.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. und Schaper, F. (2003)** Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* *374*, 1 - 20.
- Hendrie, P. C. und Russell, D. W. (2005)** Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther* *12*, 9 - 17.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. und Kishimoto, T. (1990)** Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* *63*, 1149 - 1157.
- Hiller, C., Tamgüney, G., Stolte, N., Mätz-Rensing, K., Lorenzen, D., Hör, S., Thureau, M., Wittmann, S., Slavin, S. und Fickenscher, H. (2000)** Herpesvirus saimiri pathogenicity enhanced by thymidine kinase of herpes simplex virus. *Virology* *278*, 445 - 455.
- Holbro, T., Civenni, G. und Hynes, N. E. (2003)** The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* *284*, 99 - 110.
- Holliger, P. und Hudson, P. J. (2005)** Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* *23*, 1126 - 1136.
- Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C. und Abken, H. (1997)** T cell targeting of TAG72+ tumor cells by a chimeric receptor with antibody-like specificity for a carbohydrate epitope. *Gastroenterology* *113*, 1163 - 1170.
- Hombach, A. A., Kofler, D., Rappl, G. und Abken, H. (2009)** Redirecting human CD4+CD25+ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity. *Gene Ther* *16*, 1088 - 1096.
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D. M. und Nunez G. (1998)** WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* *273*, 33489 - 33494.
- Huang, J., Meyer, C. und Zhu, C. (2012)** T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol Immunol* *52*, 155 - 164.
- Huang, X., Guo, H., Kang, J., Choi, S., Zhou, T. C., Tammana, S., Lees, C. J., Li, Z. Z., Milone, M., Levine, B. L., Tolar, J., June, C. H., Scott McIvor, R., Wagner, J. E., Blazar, B. R. und Zhou, X. (2008)** Sleeping Beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19+ lymphoid malignancies. *Mol Ther* *16*, 580 - 589.
- Huber, B. E. und Richards, C. A. (1996)** Regulated expression of artificial chimeric genes contained in retroviral vectors: implications for virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) and other gene therapy applications. *J Drug Target* *3*, 349 - 356.
- Hurtado Picó, A., Wang, X., Sipo, I., Siemietzki, U., Eberle, J., Poller, W. und Fechner, H. (2005)** Viral and nonviral factors causing nonspecific replication of tumor- and tissue-specific promoter-dependent oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* *11*, 563 - 577.
- Hüske, L. (2010)** Regulierte Fremdgenexpression durch rhadinovirale Vektoren. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Hynes, N. E. und Stern, D. F. (1994)** The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* *1198*, 165 - 184.

- Ichihara, M., Hara, T., Kim, H., Murate, T. und Miyajima, A. (1997)** Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood* *90*, 165 - 173.
- Ido, A., Nakata, K., Kato, Y., Nakao, K., Murata, K., Fujita, M., Ishii, N., Tamaoki, T., Shiku, H. und Nagataki, S. (1995)** Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human alpha-fetoprotein gene promoter. *Cancer Res* *55*, 3105 - 3109.
- Igarashi, T., Suzuki, S., Takahashi, M., Tamaoki, T. und Shimada, T. (1998)** A novel strategy of cell targeting based on tissue-specific expression of the ecotropic retrovirus receptor gene. *Hum Gene Ther* *9*, 2691 - 2698.
- Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C. G., Alder, H., Calin, G. A., Ménard, S. und Croce, C. M. (2007)** MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* *67*, 8699 - 8707.
- Irving, B. A., Chan, A. C. und Weiss, A. (1993)** Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* *177*, 1093 - 1103.
- Ivashkiv, L. B. (2007)** Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat Immunol* *10*, 340 - 347.
- Jacquier, A. und Dujon, B. (1985)** An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* *41*, 283 - 294.
- Janeway, C. A. (1992)** The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Ann Rev Immunol* *10*, 645 - 674.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. und Slack, F. J. (2005)** RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* *120*, 635 - 647.
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D. und Slack, F. J. (2007)** The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* *67*, 7713 - 7722.
- Jones, S. A., Scheller, J. und Rose-John, S. (2011)** Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* *121*, 3375 - 3383.
- June, C. H. (2007)** Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* *117*, 1466 - 1476.
- Jüttler, E., Tarabin, V. und Schwaninger, M. (2002)** Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* *8*, 268 - 275.
- Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A und June C. H. (2011)** T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* *3*, 95ra73.
- Kanai, F., Shiratori, Y., Yoshida, Y., Wakimoto H., Hamada H., Kanegae Y., Saito I., Nakabayashi H., Tamaoki T., Tanaka T., Lan K. H., Kato N., Shiina S. und Omata M. (1996)** Gene therapy for alpha-fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hepatology* *23*, 1359 - 1368.

- Kaneko, S. und Tamaoki, T. (2001)** Gene therapy vectors harboring AFP regulatory sequences. Preparation of an adenoviral vector. *Mol Biotechnol* *19*, 323 - 330.
- Karunakaran, D., Tzahar, E., Beerli, R. R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B. J., Seger, R., Hynes, N. E. und Yarden Y. (1996)** ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* *15*, 254 - 264.
- Kataoka, T., Shinohara, N., Takayama, H., Takaku, K., Kondo, S., Yonehara, S. und Nagai, K. (1996)** Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* *156*, 3678 - 3686.
- Kaufmann, S. H. und Kabelitz, D. (1991)** Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* *167*, 191 - 207.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972)** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239 - 257.
- Kersh, G. J. und Allen, P. M. (1996)** Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* *380*, 495 - 498.
- Kersh, G. J., Kersh, E. N., Fremont, D. H. und Allen, P. M. (1998)** High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* *9*, 817 - 826.
- Kershaw, M. H., Wang, G., Westwood, J. A., Pachynski, R. K., Tiffany, H. L., Marincola, F. M., Wang, E., Young, H. A., Murphy, P. M. und Hwu, P. (2002)** Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther* *13*, 1971 - 1980.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. und Brenner, H. J. (1979)** Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* *5*, 659 - 670.
- Kim, V. N. und Nam, J. W. (2006)** Genomics of microRNA. *Trends Genet* *22*, 165 - 173.
- Kishimoto, T., Akira, S. und Taga, T. (1992)** IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int J Immunopharmacol* *14*, 431 - 438.
- Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., Kroesen, B. J. und van den Berg, A. (2005)** BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* *207*, 243 - 249.
- Knappe, A., Hiller, C., Thureau, M., Wittmann, S., Hofmann, H., Fleckenstein, B. und Fickenscher, H. (1997)** The superantigen-homologous viral immediate-early gene ie14/vsag in herpesvirus saimiri-transformed human T cells. *J Virol* *71*, 9124 - 9133.
- Knappe, A., Feldmann, G., Dittmer, U., Meinel, E., Nisslein, T., Wittmann, S., Mätz-Rensing, K., Kirchner, T., Bodemer, W. und Fickenscher, H. (2000)** Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. *Blood* *95*, 3256 - 3261.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. und Aden, D. P. (1980)** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* *209*, 497 - 499.

- Kochenderfer, J. N., Feldman, S. A., Zhao, Y., Xu, H., Black, M. A., Morgan, R. A., Wilson, W. H. und Rosenberg, S. A. (2009)** Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother* 32, 689 - 702.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. und van Oers, M. H. (1994)** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415 - 1420.
- Kootstra, N. A. und Verma, I. M. (2003)** Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 413 - 439.
- Koshelnick, Y., Ehart, M., Hufnagl, P., Heinrich, P. C. und Binder, B. R. (1997)** Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem* 272, 28563 - 28567.
- Krichevsky, A. M. und Gabriely, G. (2009)** miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 13, 39 - 53.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R. und Newmeyer, D. D. (2002)** Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331 - 342.
- Lam, P. Y., Sia, K. C., Khong, J. H., De Geest, B., Lim, K. S., Ho, I. A., Wang, G. Y., Miao, L. V., Huynh, H. und Hui K. M. (2007)** An efficient and safe herpes simplex virus type 1 amplicon vector for transcriptionally targeted therapy of human hepatocellular carcinomas. *Mol Ther* 15, 1129 - 1136.
- Lane, H. A., Beuvink, I., Motoyama, A. B., Daly, J. M., Neve, R. M. und Hynes, N. E. (2000)** ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20, 3210 - 3223.
- Lazarevich, N. L. (1999)** Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry* 65, 117 - 133.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. und Earnshaw, W. C. (1994)** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346 - 347.
- Lazebnik, Y. A., Takahashi, A., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H. und Earnshaw, W. C. (1995)** Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9042 - 9046.
- Lee, E. C., Yu, D., de Velasco, J. M., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., Jenkins, N. A. und Copeland, N. G. (2001)** A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56 - 65.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. (1993)** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843 - 854.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. (2004)** A short history of a short RNA. *Cell* 116, 89 - 92, 96.
- Lee, S. I., Murthy, S. C., Trimble, J. J., Desrosiers, R. C. und Steitz, J. A. (1988)** Four novel U RNAs are encoded by a herpesvirus. *Cell* 54, 599 - 607.

- Lee, S. I. und Steitz, J. A. (1990)** Herpesvirus saimiri U RNAs are expressed and assembled into ribonucleoprotein particles in the absence of other viral genes. *J Virol* *64*, 3905 - 3915.
- Lemire, J. M. und Fausto, N. (1991)** Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res* *51*, 4656 - 4664.
- Lemoine, N. R., Jain, S., Silvestre, F., Lopes, C., Hughes, C. M., McLelland, E., Gullick, W. J. und Filipe, M. I. (1991)** Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* *64*, 79 - 83.
- Lenferink, A. E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M. L., van Vugt, M. J., Klapper, L. N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen E.J. und Yarden, Y. (1998)** Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* *17*, 3385 - 3397.
- Letourneur, F. und Klausner, R. D. (1991)** T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 8905 - 8909.
- Levy, D. E. und Darnell, J. E. (2002)** STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 656 - 662.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. und Bartel, D. P. (2005)** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15 - 20.
- Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Köhlcke, K., Eckert, H. G., Fehse, B. und Baum, C. (2002)** Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* *296*, 497.
- Lin, J. und Weiss, A. (2001)** T cell receptor signalling. *J Cell Sci* *114*, 243 - 244.
- Lonardo, F., Di Marco, E., King, C. R., Pierce, J. H., Segatto, O., Aaronson, S. A. und Di Fiore, P. P. (1990)** The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol* *2*, 992 - 1003.
- Lotze, M. T., Buchser, W. J. und Liang, X. (2012)** Blocking the interleukin 2 (IL2)-induced systemic autophagic syndrome promotes profound antitumor effects and limits toxicity. *Autophagy* *8*, 1264 - 1266.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. und Wang, X. (2000)** Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* *2*, 754 - 761.
- Maher, J. (2012)** Immunotherapy of malignant disease using chimeric antigen receptor engrafted T cells. *ISRN Oncol Artikel ID 278093*.
- Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A. und Maniatis, T. (2007)** The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* *27*, 435 - 448.
- Mann, R., Mulligan, R. C. und Baltimore, D (1983)** Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* *33*, 153 - 159.

- Manuri, P. V., Wilson, M. H., Maiti, S. N., Mi, T., Singh, H., Olivares, S., Dawson, M. J., Huls, H., Lee, D. A., Rao, P. H., Kaminski, J. M., Nakazawa, Y., Gottschalk, S., Kebriaei, P., Shpall, E. J., Champlin, R. E. und Cooper, L. J. (2010) piggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum Gene Ther* 21, 427 - 437.
- Marmor, M. D., Skaria, K. B. und Yarden, Y. (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 903 - 913.
- Martin, M. M., Lee, E. J., Buckenberger, J. A., Schmittgen, T. D. und Elton, T. S. (2006) MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 281, 18277 - 18284.
- Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K. und Umemura, T. (2007) Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 509 - 514.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Altenschmidt, U., Stöcklin, E., Wels, W. und Groner, B. (1998) Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 2661 - 2666.
- Mawatari, F., Tsuruta, S., Ido, A., Ueki, T., Nakao, K., Kato, Y., Tamaoki, T., Ishii, N. und Nakata, K. (1998) Retrovirus-mediated gene therapy for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by human alpha-fetoprotein enhancer directly linked to its promoter. *Cancer Gene Ther* 5, 301 - 306.
- McIntire, K. R., Vogel, C. L., Princler, G. L. und Patel, I. R. (1972) Serum alpha-fetoprotein as a biochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 32, 1941 - 1946.
- Meinl, E., 't Hart, B. A., Bontrop, R. E., Hoch, R. M., Iglesias, A., de Waal Malefyt, R., Fickenscher, H., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B. und Wekerle, H. (1995) Activation of a myelin basic protein-specific human T cell clone by antigen-presenting cells from rhesus monkeys. *Int Immunol* 7, 1489 - 1495.
- Melendez, L. V., Daniel, M. D., Hunt, R. D. und Garcia, F. G. (1968) An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Care* 18, 374 - 381.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T. und Patel, T. (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647 - 658.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. und Koszinowski, U. H. (1997) Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14759 - 14763.
- Mitsuyasu, R. T., Anton, P. A., Deeks, S. G., Scadden, D. T., Connick, E., Downs, M. T., Bakker, A., Roberts, M. R., June, C. H., Jalali, S., Lin, A. A., Pennathur-Das, R. und Hege K. M. (2000) Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96, 785 - 793.
- Mittrücker, H. W., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B. und Fleischer, B. (1992) CD2-mediated autocrine growth of herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes. *J Exp Med* 176, 909 - 913.

- Miyagiwa, M., Ichida, T., Tokiwa, T., Sato, J. und Sasaki, H. (1989)** A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* *25*, 503 - 510.
- Mizejewski, G. J. (1997)** alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: relevance to domain and subdomain structure. *Proc Soc Exp Biol Med* *215*, 333 - 362.
- Mizejewski, G. J. (2001)** Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med* *226*, 377 - 408.
- Moasser, M. M., Basso, A., Averbuch, S. D. und Rosen, N. (2001)** The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iress") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* *61*, 7184 - 7188.
- Moingeon, P., Chang, H. C., Sayre, P. H., Clayton, L. K., Alcover, A., Gardner, P., Reinherz, E. L. (1989)** The structural biology of CD2. *Immunol Rev* *111*, 111 - 144.
- Moon, E. K., Carpenito, C., Sun, J., Wang, L. C., Kapoor, V., Predina, J., Powell, D. J. Jr., Riley, J. L., June, C. H. und Albelda, S. M. (2011)** Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res* *17*, 4719 - 4730.
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. und Rosenberg, S. A. (2010)** Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* *18*, 843 - 851.
- Moritz, D., Wels, W., Mattern, J. und Groner, B. (1994)** Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 4318 - 4322.
- Moritz, D. und Groner, B. (1995)** A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* *2*, 539 - 546.
- Motoyama, A. B., Hynes, N. E. und Lane H. A. (2002)** The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* *62*, 3151 - 3158.
- Mountain, A. (2000)** Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* *18*, 119 - 128.
- Münster, P. N., Marchion, D. C., Basso, A. D. und Rosen N. (2002)** Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res* *62*, 3132 - 3137.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993)** IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* *260*, 1808 - 1810.
- Murphy, G. P. und Hrushesky, W. J. (1973)** A murine renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* *50*, 1013 - 1025.
- Murphy A., Westwood J. A., Brown L. E., Teng M. W., Moeller M., Xu Y., Smyth M. J., Hwu P., Darcy P. K. und Kershaw M. H. (2007)** Antitumor activity of dual-specific T cells and influenza virus. *Cancer Gene Ther* *14*, 499 - 508.

- Murphy, K. M. (2011)** Janeway's Immunobiology Taylor & Francis; Auflage: 8th edition.
- Murthy, S., Kamine, J. und Desrosiers, R. C. (1986)** Viral-encoded small RNAs in herpes virus saimiri induced tumors. *EMBO J* 5, 1625 - 1632.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Testa, G. und Stewart, A. F. (1999)** Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res* 27, 1555 - 1557.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. und Sato, J. (1982)** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42, 3858 - 3863.
- Nakabayashi, H., Hashimoto, T., Miyao, Y., Tjong, K. K., Chan, J. und Tamaoki, T. (1991)** A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma. *Mol Cell Biol* 11, 5885 - 5893.
- Neddermann, P., Graziani, R., Ciliberto, G. und Paonessa, G. (1996)** Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 271, 30986 - 30991.
- Neve, R. M., Sutterlüty, H., Pullen, N., Lane, H. A., Daly, J. M., Krek, W. und Hynes, N. E. (2000)** Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 19, 1647 - 1656.
- Núñez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. und Inohara N. (1998)** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237 - 3245.
- Nussler, A. K., Vergani, G., Gollin, S. M., Dorko, K., Morris, S. M., Demetris, A. J., Nomoto, M., Beger, H. G. und Strom, S. C. (1999)** Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 190 - 197.
- Nyrén, P. (2007)** The history of pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 373, 1 - 14.
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. und Baltimore, D. (2007)** MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 1604 - 1609.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. und Hynes, N. E. (2000)** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19, 3159 - 3167.
- O'Shea, J. J., Gadina, M. und Schreiber, R. D. (2002)** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109, 121 - 131.
- Parente-Pereira, A. C., Burnet, J., Ellison, D., Foster, J., Davies, D. M., van der Stegen, S., Burbidge, S., Chiapero-Stanke, L., Wilkie, S., Mather, S. und Maher, J. (2011)** Trafficking of CAR-engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice. *J Clin Immunol* 31, 710 - 718.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. und Ruvkun, G. (2000)** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86 - 89.
- Pawson, T. und Scott, J. D. (1997)** Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075 - 2080.

- Pegram, H. J., Lee, J. C., Hayman, E. G., Imperato, G. H., Tedder, T. F., Sadelain, M. und Brentjens, R. J. (2012) Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 119, 4133 - 4141.
- Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., Chien, K. R., Baker, J. B. und Wood, W. I. (1995) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1142 - 1146.
- Pinthus, J. H., Waks, T., Malina, V., Kaufman-Francis, K., Harmelin, A., Aizenberg, I., Kanety, H., Ramon, J. und Eshhar, Z. (2004) Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J Clin Invest* 114, 1774 - 1781.
- Podar, K., Tai, Y. T., Cole, C. E., Hideshima, T., Sattler, M., Hamblin, A., Mitsiades, N., Schlossman, R. L., Davies, F. E., Morgan, G. J., Munshi, N. C., Chauhan, D. und Anderson, K. C. (2002) Essential role of caveolae in IL-6- and IGF-I- triggered Akt-1- mediated survival of multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 278, 5794 - 5801.
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. und June, C. H. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365 725 - 733.
- Press, M. F., Cordon-Cardo, C. und Slamon, D. J. (1990) Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5, 953 - 962.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J. und Robinson, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 6, 945 - 956.
- Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M. H., Liu, E., Gee, A. P., Mei, Z., Yvon, E., Weiss, H. L., Liu, H., Rooney, C. M., Heslop, H. E. und Brenner, M. K. (2008) Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14, 1264 - 1270.
- Purves, L. R., MacNab, M., Geddes, E. W. und Bersohn, I. (1968) Serum-alpha-foetoprotein and primary hepatic cancer. *Lancet* 1, 921 - 922.
- Rao, P. K., Kumar, R. M., Farkhondeh, M., Baskerville, S. und Lodish, H. F. (2006) Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8721 - 8726.
- Razani, B., Schlegel, A., Liu, J. und Lisanti, M. P. (2001) Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 29, 494 - 499.
- Recchia, A., Bonini, C., Magnani, Z., Urbinati, F., Sartori, D., Muraro, S., Tagliafico, E., Bondanza, A., Stanghellini, M. T., Bernardi, M., Pescarollo, A., Ciceri, F., Bordignon, C. und Mavilio, F. (2006) Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1457 - 1462.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R. und Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901 - 906.
- Robbins, P. D., Tahara, H. und Ghivizzani, S. C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 16, 35 - 40.

- Roberts, M. R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D. H., Tran, A. C., Dull, T. J., Groopman, J. E., Capon, D. J., Byrn, R. A. und Finer, M. H. (1994) Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* 84, 2878 - 2889.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., van Dongen, S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M. und Bradley, A. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608 - 611.
- Ronaghi, M. (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11, 3 - 11.
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P. und White, D. E. (1988) Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319, 1676 - 1680.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. und Dudley, M. E. (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8, 299 - 308.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. und Wilson, I. A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Review of Immunology* 24, 419 - 466.
- Ruoslahti, E. und Seppälä, M. (1971) Studies of carcino-fetal proteins. 3. Development of a radioimmunoassay for α -fetoprotein. Demonstration of -fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int J Cancer* 8, 374 - 383.
- Ruvkun, G. (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294, 797 - 799.
- Ryu, J. R., Olson, L. K. und Arnosti, D. N. (2001) Cell-type specificity of short-range transcriptional repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12960 - 12965.
- Sadelain, M., Rivière, I. und Brentjens, R. (2003) Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3, 35 - 45.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. und Tsujimoto, Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401, 168 - 173.
- Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N. und Aradhyam, G. K. (2007) Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* 462, 103 - 114.
- Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T. und Kishimoto, T. (1992) Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immuno* 148, 4066 - 4071.
- Sakahira, H., Enari, M. und Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96 - 99.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. und Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hemato* 19, 183 - 232.

- Saraste, A. und Pulkki, K. (2000)** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528 - 537.
- Sato, Y., Tanaka, K., Lee, G., Kanegae, Y., Sakai, Y., Kaneko, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. und Saito, I. (1998)** Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 455 - 462.
- Sauce, D., Tonnelier, N., Duperrier, A., Petracca, B., de Carvalho Bittencourt, M., Saadi, M., Saas, P., Ferrand, C., Herve, P., Tiberghien, P. und Robinet, E. (2002)** Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 11, 929 - 940.
- Sauter, G., Moch, H., Moore, D., Carroll, P., Kerschmann, R., Chew, K., Mihatsch, M. J., Gudat, F. und Waldman, F. (1993)** Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 53, 2199 - 2203.
- Savoldo, B., Ramos, C. A., Liu, E., Mims, M. P., Keating, M. J., Carrum, G., Kamble, R. T., Bollard, C. M., Gee, A. P., Mei, Z., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K. und Dotti, G. (2011)** CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 121, 1822 - 1826.
- Schäfer, A., Lengenfelder, D., Grillhösl, C., Wieser, C., Fleckenstein, B. und Ensner, A. (2003)** The latency-associated nuclear antigen homolog of herpesvirus saimiri inhibits lytic virus replication. *J Virol* 77, 5911 - 5925.
- Schlegel, A., Pestell, R.G. und Lisanti M. P. (2000)** Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease. *Front Biosci* 5, 929 - 937.
- Schlessinger, J. (2000)** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211 - 225.
- Schmidt, M., McWatters, A., White, R. A., Groner, B., Wels, W., Fan, Z. und Bast, R. C. Jr. (2001)** Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [scFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2. *Gynecol Oncol* 80, 145 - 155.
- Schneider, U., Schwenk, H. U. und Bornkamm, G. (1977)** Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621 - 626.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, Bertoglio, J. und Bred, J. (2001)** Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346 - 352.
- Sehgal, P. B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V. und Patel, K. (2002)** Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J Biol Chem* 277, 12067 - 12074.
- Seliger, B. (2008)** Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors. *J Immunotoxicol* 5, 361 - 367.
- Serrano, L. M., Pfeiffer, T., Olivares, S., Numbenjapon, T., Bennitt, J., Kim, D., Smith, D., McNamara, G., Al-Kadhimi, Z., Rosenthal, J., Forman, S. J., Jensen, M. C. und Cooper, L. J. (2006)** Differentiation of naive cord-blood T cells into CD19-specific cytolytic effectors for posttransplantation adoptive immunotherapy. *Blood* 107, 2643 - 2652.

- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. und Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8794 - 8797.
- Singh, H., Manuri, P. R., Olivares, S., Dara, N., Dawson, M. J., Huls, H., Hackett, P. B., Kohn, D. B., Shpall, E. J., Champlin, R. E. und Cooper, L. J. (2008) Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res* 68, 2961 - 2971.
- Skalsky, R. L., Samols, M. A., Plaisance, K. B., Boss, I. W., Riva, A., Lopez, M. C., Baker, H. V. und Renne, R. (2007) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* 81, 12836 - 12845.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. und Press, M. F. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707 - 712.
- Smith, J. B. und Todd, D. (1968) Foetoglobulin and primary liver cancer. *Lancet* 2, 833.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409 - 1416.
- Springer, T. A., Dustin, M. L., Kishimoto, T. K. und Marlin, S. D. (1987) The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 5, 223 - 252.
- Spyridonidis, A., Schmidt, M., Bernhardt, W., Papadimitriou, A., Azemar, M., Wels, W., Groner, B. und Henschler, R. (1998) Purging of mammary carcinoma cells during ex vivo culture of CD34+ hematopoietic progenitor cells with recombinant immunotoxins. *Blood* 91, 1820 - 1827.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., MacFarlane, M., Luo, Z., Huang, Z., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (1998a) Generation of Constitutively Active Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of Their Subunits. *J Biol Chem* 273, 10107 - 10111.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S. (1998b) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949 - 957.
- Sorkin, A., Di Fiore, P. P. und Carpenter, G. (1993) The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene* 8, 3021 - 3028.
- Stevenson, A. J., Clarke, D., Meredith, D. M., Kinsey, S. E., Whitehouse, A. und Bonifer, C. (2000) Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors maintain heterologous expression throughout mouse embryonic stem cell differentiation in vitro. *Gene Ther* 7, 464 - 471.
- Straathof, K. C., Pulè, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Spencer, D. M. und Rooney, C. M. (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105, 4247 - 4254.

- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. und Trapani, J. A. (2000)** Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* *192*, 1403 - 1414.
- Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M. und Trapani, J. A. (2003)** Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* *18*, 319 - 329.
- Tam, W. und Dahlberg, J. E. (2006)** miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer* *45*, 211 - 212.
- Tatarinov, J. S. (1964)** Detection of embryo-specific alpha-globulin in the blood serum of a petient with primary liver cancer. *Vopr Med Khim* *10*, 90 - 91.
- Terakura, S., Yamamoto, T. N., Gardner, R. A., Turtle, C. J., Jensen, M. C. und Riddell, S. R. (2012)** Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood* *119*, 72 - 82.
- Terentiev, A. A. und Moldogazieva, N. T. (2006)** Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry* *71*, 120 - 132.
- Thurau, M., Whitehouse, A., Wittmann, S., Meredith, D. und Fickenscher, H. (2000).** Distinct transcriptional and functional properties of the R transactivator gene orf50 of the transforming herpesvirus saimiri strain C488. *Virology* *268*, 167 - 177.
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Chen, E. Y., Wood, B. L., Greisman, H. A., Qian, X., James, S. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Lindgren, C. G., Greenberg, P. D., Riddell, S. R. und Press, O. W. (2008)** Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* *112*, 2261 - 2271.
- Tischer, B. K., von Einem, J., Kaufer, B. und Osterrieder, N. (2006)** Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* *40*, 191 - 197.
- Todaro, G. J., Wolman, S. R. und Green H. (1963)** Rapid transformation of human fibroblasts with low growth potential into established cell lines by SV40. *J Cell Physiol* *62*, 257 - 265.
- Toptan, T., Ensser, A. und Fickenscher, H. (2010a)** Rhadinovirus vector-derived human telomerase reverse transcriptase expression in primary T cells. *Gene Ther* *17*, 653 - 661
- Toptan, T. (2010b)** Rhadinovirus vector-mediated transgene expression and regulation. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg.
- Toptan, T., Danke, C., Bremer, L., Ensser, A., Hillen, W., Berens, C. und Fickenscher, H. (2014)** Highly efficient and regulatable transgene expression by non-integrating herpesvirus saimiri-based rhadinovirus vectors. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Traversari, C., Marktel, S., Magnani, Z., Mangia, P., Russo, V., Ciceri, F., Bonini, C. und Bordignon, C. (2007)** The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood* *109*, 4708 - 4715.
- Trempe, G. L. (1976)** Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res* *57*, 33 - 41.

- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990)** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203 - 212.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. und Hillen, W. (2000)** Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7963 - 7968.
- Veillette, A., Abraham, N., Caron, L. und Davidson, D. (1991)** The lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56^{lck}. *Semin Immunol* 3, 143 - 152.
- van Zijl, M., Quint, W., Briaire, J., de Rover, T., Gielkens, A. und Berns, A. (1988)** Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol* 62, 2191 - 2195.
- Voelkel-Johnson, C., Entingh, A. J., Wold, W. S., Gooding, L. R. und Laster, S. M. (1995)** Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* 154, 1707 - 1716.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. und Croce, C. M. (2006)** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2257 - 2261.
- von Minckwitz, G., Harder, S., Hövelmann, S., Jäger, E., Al-Batran, S. E., Loibl, S., Atmaca, A., Cimpoiasu, C., Neumann, A., Abera, A., Knuth, A., Kaufmann, M., Jäger, D., Maurer, A. B. und Wels, W. S. (2005)** Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res* 7, 617 - 626.
- Wagner, M., Ruzsics, Z. und Koszinowski, U. H. (2002)** Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol* 10, 318 - 324.
- Wallich, R., Brenner, C., Brand, Y., Roux, M., Reister, M. und Meuer, S. (1998)** Gene structure, promoter characterization, and basis for alternative mRNA splicing of the human CD58 gene. *J Immunol* 160, 2862 - 2871.
- Walther, W. und Stein, U. (2000)** Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60, 249 - 271.
- Walz, N., Christalla, T., Tessmer, U. und Grundhoff, A. (2010)** A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs. *Virology* 84, 716 - 728.
- Wang, L. X., Westwood, J. A., Moeller, M., Duong, C. P., Wei, W. Z., Malaterre, J., Trapani, J. A., Neeson, P., Smyth, M. J., Kershaw, M. H. und Darcy, P. K. (2010)** Tumor ablation by gene-modified T cells in the absence of autoimmunity. *Cancer Res* 70, 9591 - 9598.
- Wassarman, D. A., Lee, S. I. und Steitz, J. A. (1989)** Nucleotide sequence of HSUR 5 RNA from herpesvirus saimiri. *Nucleic Acids Res* 17, 1258.
- Watanabe, K., Saito, A. und Tamaoki, T. (1987)** Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* 262, 4812 - 4818.

- Weber, F., Meinl, E., Drexler, K., Czlonkowska, A., Huber, S., Fickenscher, H., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1993) Transformation of human T-cell clones by herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 11049 - 11053.
- Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B. und Hynes, N. E. (1992) Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res* *52*, 6310 - 6317.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B. und Hynes, N. E. (1995) EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer* *60*, 137 - 144.
- Whitehouse, A. (2003) Herpesvirus saimiri: a potential gene delivery vector. *Int J Mol Med* *11*, 139 - 148.
- Wienholds, E. und Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* *579*, 5911 - 5922.
- Wilkie, S., Picco, G., Foster, J., Davies, D. M., Julien, S., Cooper, L., Arif, S., Mather, S. J., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J. M. und Maher, J. (2008) Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* *180*, 4901 - 4909.
- Wolf, B. B., Schuler, M., Echeverri, F. und Green, D. R. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* *274*, 30651 - 30656.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. und Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* *68*, 251 - 306.
- Worthylake, R., Opresko, L. K. und Wiley, H. S. (1999) ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* *274*, 8865 - 8874.
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S. und Kellis, M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* *434*, 338 - 345.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C. L. (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* *62*, 4132 - 4141.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127 - 137.
- Yeom, K. H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R. und Kim, V. N. (2006) Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* *34*, 4622 - 4629.
- Yin, Q., McBride, J., Fewell, C., Lacey, M., Wang, X., Lin, Z., Cameron, J. und Flemington E. K. (2008) MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol* *82*, 5295 - 5306.

- Yin, T., Taga, T., Tsang, M. L., Yasukawa, K., Kishimoto, T. und Yang, Y. C. (1993)** Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol* *151*, 2555 - 2561.
- Yoshima, H., Mizuochi, T., Ishii, M. und Kobata, A. (1980)** Structure of the asparagine-linked sugar chains of alpha-fetoprotein purified from human ascites fluid. *Cancer Res* *40*, 4276 - 4281.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. und Kishimoto, T. (1996)** Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 407 - 411.
- Yu, D., Jing, T., Liu, B., Yao, J., Tan, M., McDonnell, T. J. und Hung, M.C. (1998)** Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* *2*, 581 - 591.
- Yun, C. O., Nolan K. F., Beecham E. J., Reisfeld R. A. und Junghans R. P. (2000.)** Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors. *Neoplasia* *2*, 449 - 459.
- Zhang, C. M., Zhao, J. und Deng, H. Y. (2013)** MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* *20*, 79.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. und Stewart, A. F. (1998)** A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* *20*, 123 - 128.
- Zhao, Y., Samal, E. und Srivastava, D. (2005)** Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* *436*, 214 - 220.
- Zhu, S., Si, M. L., Wu, H. und Mo, Y. Y. (2007)** MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* *282*, 14328 - 14336.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S. und Mo, Y. Y. (2008)** MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* *18*, 350 - 359.
- Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Liénard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J. C., Romero, P. und Pittet, M. J. (2004)** Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* *64*, 2865 - 2873.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. und Wang, X. (1999)** An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* *274*, 11549 - 11556.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Fickenscher für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während meiner Dissertation bedanken. Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig, der das Zweitgutachten für diese Arbeit übernommen hat.

Für die Bereitstellung der primären Tumorzellen bedanke ich mich bei Prof. Dr. Norbert Arnold und Frank Rösel. Meinen Kooperationspartnern in Hamburg (Prof. Dr. Adam Grundhoff, Dr. Nicole Walz und Dr. Christine Dahlke) und Innsbruck (Prof. Dr. Michaela Kress, Dr. Serena Quarta und Max Metzdorf) danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Werner und Klara Kreitz Stiftung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Gregor Maschkowitz bedanken. Während meiner Urlaubstage war auf sein T-Zell-Hotel, indem ich meine T-Lymphozytenkulturen unterbringen durfte, stets verlass.

Dr. Tuna Toptan hat mir trotz der Entfernung über den großen Teich immer wieder sinnvolle Tipps gegeben - vielen Dank dafür!

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Oliver Braum und Anne-Kathrin Brunnemann für die anregenden Diskussionen und angenehmen Stunden im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist. Zusammen mit meinen Freunden haben sie mir in meiner begrenzten Freizeit ein paar schöne, freie Stunden beschert.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Lars bedanken, ohne den ich zwischendurch den Mut verloren hätte, diesen Weg zu Ende zu gehen.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name: Linda Bremer geb. Hüske
Geburtstag: 27. Juni 1984
Geburtsort: Soest
Familienstand: verheiratet

Schulischer Werdegang

28.06.2003 Allgemeine Hochschulreife
1994-2003 Archigymnasium, Soest
1990-1994 Johannes Grundschule, Soest

Beruflicher Werdegang

seit 2010 Doktorandin am Institut für Infektionsmedizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
30.03.2010 Abschluss: Diplom Biochemie/Molekularbiologie (mit Auszeichnung)
Thema „Regulierte Fremdgenexpression durch rhadinovirale Vektoren“
2007-2010 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
14.09.2007 Vordiplom Biochemie/Molekularbiologie
2005-2007 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität zu Jena
30.06.2005 Staatlich geprüfte biologisch-technische Assistentin
2003-2005 Berufskolleg Hilden des Kreises Mettmann, Hilden

Eigene Drittmittel

2011 Werner und Klara Kreitz Stiftung
Stiftung zur Förderung der Krebsforschung durch Unterstützung von universitären Forschungsvorhaben in Schleswig-Holstein

Zusatzqualifikationen

2013 Projektmanagement für Nachwuchswissenschaftler
2013 Summerschool “Gene Therapy and Regenerative Medicine“
2011 Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung

Betreuung

- 2013-2014 der Masterstudentin Ines Heyn
2011/2013 von Laborpraktikanten (3-6 Wochen)
2011-2013 des Kurspraktikums “Molekulare Infektionsbiologie: Virologie“
2010-2011 des Diplomanden Björn Brändl

Vorträge

- 2013 8th Mini-Herpesvirus Workshop – Berlin, Deutschland
Hepatoma-cell specific and tetracycline-inducible apoptosis from rhadino-viral vectors

2011 6th Mini-Herpesvirus Workshop – Berlin, Deutschland
Stable and functional expression of an anti-tumor immuno-receptor in a tricistronic configuration from a latent rhadino-viral promoter

2011 21st Annual Meeting of the Society for Virology – Freiburg i. Breisgau, Deutschland
Efficient tumor-cell killing by T lymphocytes after rhadinovirus-mediated transfer of chimeric T-cell receptors

Posterpräsentationen

- 2013 23st Annual Meeting of the Society for Virology – Kiel, Deutschland
Induction of apoptosis in hepatoma cells through Tet- and AFP-regulated gene expression by rhadinoviral vectors

2013 23st Annual Meeting of the Society for Virology – Kiel, Deutschland
Specific killing of ErbB2-positive tumor cells by functional expression of an anti-tumor immunoreceptor in a tricistronic configuration from a latent rhadinoviral promoter in T cells

2013 19st Annual Meeting German Society for Gene Therapy – Hamburg, Deutschland
Induction of apoptosis in hepatoma cells through Tet- and AFP-regulated gene expression by rhadinoviral vectors

- 2013 19st Annual Meeting German Society for Gene Therapy – Hamburg, Deutschland
Specific killing of ErbB2-positive tumor cells by functional expression of an anti-tumor immunoreceptor in a tricistronic configuration from a latent rhadinoviral promoter in T cells
- 2012 22th Annual Meeting of the Society for Virology – Essen, Deutschland
Rhadinoviral vectors for Tet- and AFP-regulated expression in hepatoma cells
- 2011 36th International Herpesvirus Workshop – Gdansk, Polen
Efficient tumor-cell killing by T lymphocytes after rhadinovirus-mediated transfer of chimeric T-cell receptors
- 2010 4th European Congress of Virology – Cernobbio, Italien
Highly efficient and regulatable transgene expression by nonintegrating herpesvirus saimiri based rhadinovirus vectors

Abstrakte

- 2012 7th Mini-Herpesvirus Workshop – Hamburg, Deutschland
The highly tumorigenic HVS strain C488 encodes a single evolutionary conserved pre-microRNA
- 2012 22th Annual Meeting of the Society for Virology – Essen, Deutschland
The highly tumorigenic HVS strain C488 encodes a single evolutionary conserved pre-microRNA (Poster)
- 2010 5th Mini-Herpesvirus Workshop – Berlin, Deutschland
Regulatable transgene expression of rhadinoviral vectors

Publikationen

Bremer, L., Toptan, T., Arnold, N., Wels, W. S., and Fickenscher, H. (2014). Redirected of ErbB2-specific tumor cell lysis via chimeric T-cell receptors expressed by rhadinovirus vector-transduced primary T-lymphocytes. In Vorbereitung.

Bremer, L., Brändl, B., Toptan, T., and Fickenscher, H. (2014). Induction of apoptosis in hepatoma cells through Tet- and AFP-regulated gene expression by rhadinoviral vectors. In Vorbereitung.

Walz N., **Bremer, L.**, Christalla T., Toptan, T., Fickenscher, H., and Grundhoff, A. (2014). The highly tumorigenic HVS strain C488 encodes a single evolutionary conserved pre-microRNA. In Vorbereitung.

Toptan, T., Danke, C., **Bremer, L.**, Ensser, A., Hillen, W., Berens, C., and Fickenscher, H. (2014). Highly efficient and regulatable transgene expression by non-integrating herpesvirus saimiri based rhadinovirus vectors. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Yamamoto, K., Trad, A., Baumgart, A., **Hüske, L.**, Lorenzen, I., Chalaris, A., Grötzinger, J., Dechow, T., Scheller, J., and Rose-John, S. (2012). A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell mediated lysis of prostate cancer cells. *Biochem J* 445, 135–144

Wussow, F., Spieckermann, T., Brunnemann, A., **Hüske, L.**, Toptan, T., and Fickenscher H. (2011). Bacterial Genetics of Large Mammalian DNA Viruses: Bacterial Artificial Chromosomes as a Prerequisite for Efficiently Studying Viral DNA Replication and Functions. *DNA Replication current advances*, Hervé Seligmann, InTech 669 - 694

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

“Rhadinovirale Vektoren zum Transfer unter Latenz exprimierter oder induzierbarer Gene
in primäre T-Lymphozyten, Hepatozyten und sensorische Neurone und
zur Umleitung der T-Zell-Spezifität auf ein Tumorantigen “

selbstständig nach den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis, unter der wissenschaftlichen Anleitung meines Betreuers und unter der ausschließlichen Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Fakultät im Rahmen einer Prüfung vorgelegt und auch nicht veröffentlicht. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 21. Januar 2014

Linda Bremer